

TRABALLO DE FIN DE GRAO

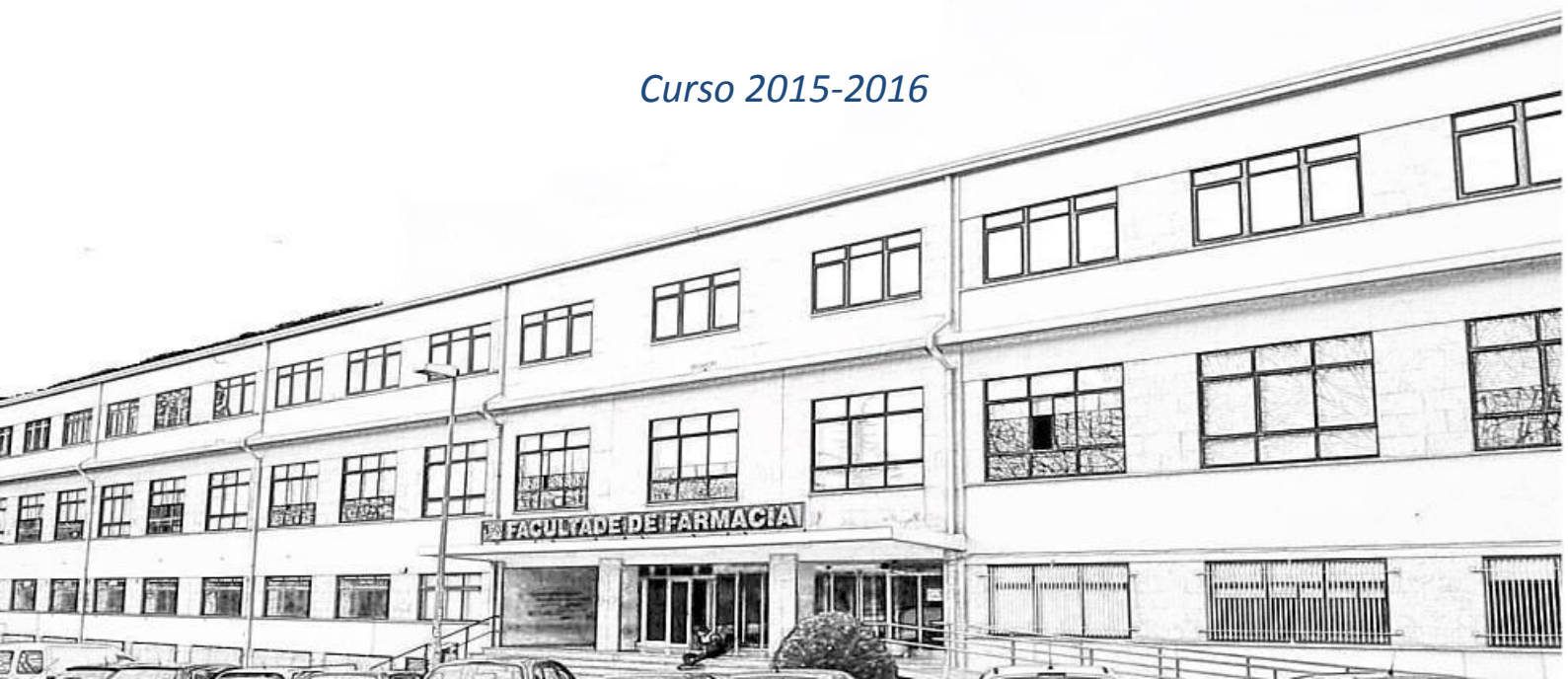
Lucía Paniagua
González



**Desarrollo de un método analítico para la determinación de
nicotina y sus metabolitos en muestras materno-fetales**

**Development of an analytical method for the determination of
nicotine and its metabolites in maternal-fetal samples**

Curso 2015-2016



ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN..... | 3 |
| ABSTRACT | 4 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.1. Epidemiología del consumo de tabaco en mujeres embarazadas | 5 |
| 1.2. Exposición al humo del tabaco durante el embarazo: historia, tipos de exposición y efectos de la misma sobre la madre y el feto | 9 |
| 1.3. Determinación del consumo de tabaco durante el embarazo | 14 |
| 1.3.1. Muestras procedentes de la madre | 15 |
| 1.3.2. Muestras procedentes del feto o recién nacido | 16 |
| 1.3.3. Muestras procedentes de ambos | 17 |
| 1.4. La placenta y el cordón umbilical como matrices biológicas. Fisiología y mecanismos de incorporación de sustancias externas | 18 |
| 1.5. Técnica experimental | 21 |
| 1.5.1. La nicotina y sus metabolitos..... | 21 |
| 1.5.2. Extracción en Fase Sólida (SPE)..... | 23 |
| 1.5.3. Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) | 24 |
| 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS..... | 27 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 29 |
| 3.1. Instrumentación | 29 |
| 3.1.1. Instrumentación para el pretratamiento de las muestras | 29 |
| 3.1.2. Instrumentación para la detección de los analitos | 29 |
| 3.2. Reactivos | 30 |
| 3.3. Preparación de las disoluciones de trabajo | 30 |
| 3.3.1. Preparación de las disoluciones de calibración y de control de calidad (QC) | 30 |
| 3.3.2. Preparación de otras disoluciones..... | 32 |
| 3.4. Preparación de la muestra..... | 32 |
| 3.5. Extracción en fase sólida de la muestra..... | 33 |
| 3.6. Condiciones de la cromatografía líquida (LC) | 33 |
| 3.7. Condiciones de la espectrometría de masas (MS/MS) | 34 |
| 3.8. Validación | 35 |
| 3.8.1. Linealidad | 35 |
| 3.8.2. Exactitud e imprecisión interdía, intradía y total | 36 |
| 3.8.3. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)..... | 36 |
| 3.8.4. Selectividad | 37 |
| 3.8.5. Efecto matriz, rendimiento de la extracción y eficacia total del proceso | 37 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.8.6. | Estabilidad | 38 |
| 3.9. | Aplicación a casos reales | 39 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 40 |
| 4.1. | Método analítico | 40 |
| 4.2. | Validación | 42 |
| 4.2.1. | Linealidad | 42 |
| 4.2.2. | Exactitud e imprecisión interdía, intradía y total | 42 |
| 4.2.3. | Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) | 43 |
| 4.2.4. | Selectividad | 45 |
| 4.2.5. | Efecto matriz, rendimiento de la extracción y eficacia total del proceso | 46 |
| 4.2.6. | Estabilidad | 48 |
| 4.3. | Aplicación a casos reales. | 49 |
| 5. | CONCLUSIONES | 54 |
| 6. | BIBLIOGRAFÍA | 55 |
| | Agradecimientos | 59 |

RESUMEN

El consumo, tanto activo como pasivo, de tabaco por parte de las mujeres gestantes representa un importante problema de salud en nuestro país. Las matrices biológicas empleadas para el estudio de la exposición a sustancias intra-útero en toxicología son variadas e incluyen el pelo (considerado el “gold standard”), el meconio, y más recientemente, la placenta y el cordón umbilical. Estas dos últimas constituyen muestras materno-fetales alternativas con un gran potencial ya que son tejidos en estrecho contacto con el feto, son considerados productos de “desecho”, y además están disponibles en grandes cantidades y pueden obtenerse en el momento del parto mediante métodos no invasivos. En el presente trabajo se ha desarrollado y validado un método para la detección de nicotina, cotinina e hidroxicotinina en placenta y cordón umbilical.

El análisis se realizó mediante LC-MS/MS, utilizándose para ello una columna de interacción hidrofílica (Atlantis® HILIC Silica) y un gradiente con Formiato amónico 2mM+AF 0,1% y ACN+0,1% AF, en un tiempo total de 15 min. Para la detección se ha utilizado un triple cuadrupolo con interfase ESI+. El método ha sido validado satisfactoriamente en ambas matrices para los parámetros de: linealidad, exactitud, imprecisión, límite de detección y límite de cuantificación, selectividad, efecto matriz, rendimiento de la extracción, eficacia total del proceso y estabilidad.

Finalmente, el método fue aplicado a muestras procedentes de 32 partos, y los resultados fueron comparados con la entrevista materna y los resultados analíticos obtenidos en el pelo materno.

Palabras clave: nicotina, placenta, cordón umbilical, tabaco, LC-MS/MS

ABSTRACT

Consumption, both active and passive, of smoked cigarettes by pregnant women represents a big health problem in our country. The biological matrices used to study the intrauterine exposure to substances in toxicology are varied and include hair (considered the “gold standard”), meconium, and recently, placenta and umbilical cord. Both placenta and cord are maternal-fetal alternative samples that show a great potential because they are tissues in close contact with the fetus and considered "waste material". They are also available in large quantities and can be obtained at the time of delivery by non-invasive methods. In this study, a method for the detection of nicotine, cotinine and hydroxycotinine in placenta and umbilical cord was developed and validated.

The analysis was performed by LC-MS/MS, using for this purpose a column of hydrophilic interaction (Atlantis® HILIC Silica) and a gradient of Ammonium Formate 2mM + FA 0.1% and ACN + 0.1% FA in a total run time of 15 min. For the detection a triple quadrupole with ESI + interface was used. The method was successfully validated in both matrices for the following parameters: linearity, accuracy, imprecision, limit of detection and limit of quantification, selectivity, matrix effect, extraction efficiency, overall process efficiency and stability.

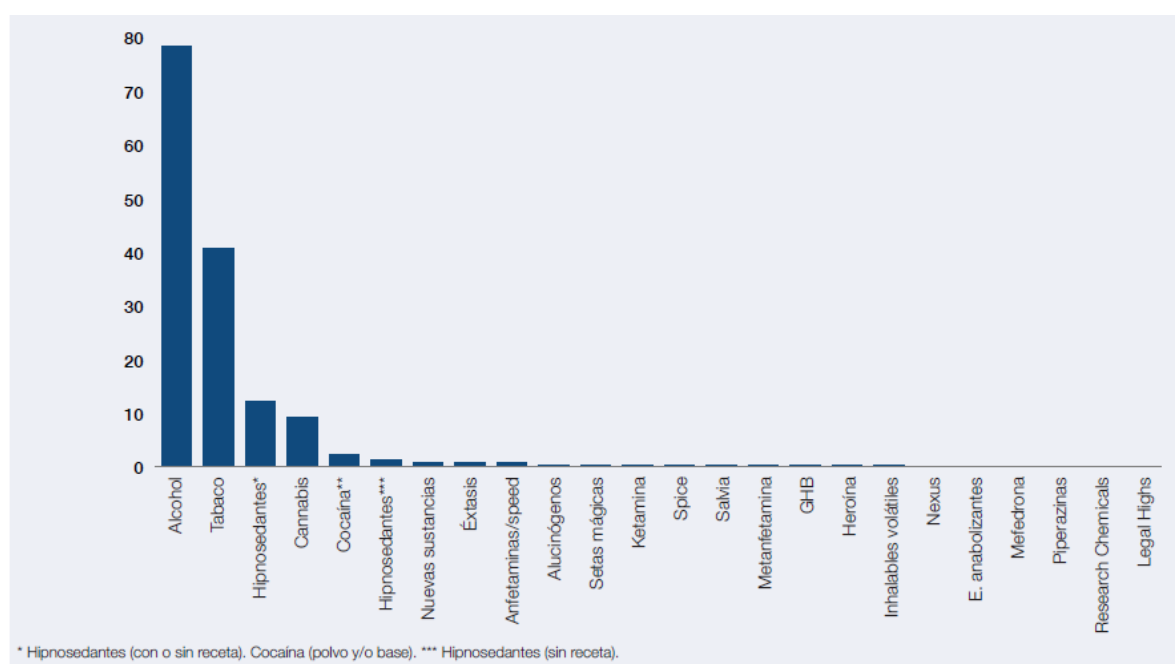
Finally, the method was applied to samples from 32 deliveries, and the results were compared with the maternal interviews and the analytical results in the mother's hair.

Keywords: nicotine, placenta, umbilical cord, tobacco, LC-MS/MS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología del consumo de tabaco en mujeres embarazadas

Los resultados de la última encuesta EDADES (Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España, 2013) reflejan que, en nuestro país, el alcohol y el tabaco siguen siendo las sustancias psicoactivas que presentan una mayor prevalencia de consumo (78,3% y 40,7%, respectivamente, durante los últimos 12 meses, como se puede observar en la Figura 1). Además, el tabaco se erige como la droga de mayor prevalencia de consumo diario (30,8%), por encima incluso del alcohol (9,8%), como se indica en la Figura 2 [1].



| Sustancia psicoactiva | Prevalencia de consumo últimos 12 meses (%) |
|-----------------------|---|
| Alcohol | 78,3 |
| Tabaco | 40,7 |

Figura 1. Prevalencia de consumo (en porcentajes) de sustancias psicoactivas en los últimos 12 meses en la población de 15-64 años. España, 2013 (Tomada de [1]).

| | 1997 | 1999 | 2001 | 2003 | 2005 | 2007 | 2009 | 2011 | 2013 |
|---------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Tabaco | 34,9 | 33,6 | 35,7 | 36,7 | 32,8 | 29,6 | 31,8 | 30,4 | 30,8 |
| Alcohol | 12,7 | 13,7 | 15,7 | 14,1 | 14,9 | 10,2 | 11,0 | 10,2 | 9,8 |
| Cannabis | 0,7 | 0,8 | 1,5 | 1,5 | 2,0 | 1,6 | 2,0 | 1,7 | 1,9 |
| Tranquilizantes (con o sin receta) | – | – | – | – | – | 2,6 | 2,3 | 4,0 | 5,9 |
| Somníferos (con o sin receta) | – | – | – | – | – | 1,1 | 1,4 | 1,7 | 3,1 |
| Hipnosedantes (con o sin receta) | – | – | – | – | – | 3,1 | 2,7 | 4,6 | 6,8 |

Figura 2. Prevalencia (en porcentajes) de consumo diario de sustancias psicoactivas en la población de 15-64 años. España, 1997-2013 (Tomada de [1]).

La información sobre la prevalencia del consumo de tabaco en mujeres gestantes es, sin embargo, muy limitada. Esto se debe a que el método más empleado para documentar el consumo de tabaco durante el embarazo, la entrevista materna, constituye un método de escasa fiabilidad debido a las connotaciones sociales negativas, ya que la mayoría son conscientes de que su consumo supone un riesgo para el feto [2-5].

Uno de los estudios que proporciona más datos sobre este tema en la actualidad fue realizado en EEUU, donde se llevó a cabo un proyecto de investigación denominado PRAMS (*Pregnancy Risk Assessment and Monitoring System*), en el que participaron varios organismos como el CDC (*Centers of Disease Control and Prevention*), con el fin de recabar información mediante cuestionarios realizados en 26 de los Estados a mujeres antes, durante y después del embarazo, con la finalidad de mejorar los programas de salud existentes. Las entrevistas tuvieron lugar en varias fases, correspondiendo la última a los años 2009-2011 [6]. La prevalencia global de tabaquismo durante los últimos 3 meses del embarazo en el último año registrado (2011) fue del 10,2%, aunque se produjeron importantes diferencias de un Estado a otro (desde un 4,0% en Utah hasta un 29,0% en Virginia Occidental). En ese mismo año, la proporción global de mujeres que dejaron de fumar durante el embarazo (tomando como referencia las mujeres que fumaron los 3 meses anteriores a quedarse embarazadas) fue del 54,9% (con una gran variación que va desde el 82,1% en la ciudad de Nueva York al 35,3% en

Virginia Occidental) [7]. Además, los investigadores fueron capaces de clasificar a las participantes en el estudio según sus características demográficas, llegando a relacionar el consumo de tabaco durante el embarazo con factores como el nivel de estudios (a mayor nivel de estudios, menor prevalencia de tabaquismo durante la gestación), la edad (las menores prevalencias aparecieron en mujeres mayores de 35 años y, las mayores, en mujeres entre 20 y 24 años) y la raza (las mayores prevalencias aparecieron en las poblaciones de mujeres nativas de Alaska e indias americanas y, las menores, en mujeres asiáticas e hispanas) [8,9].

En España no se han realizado estudios de esta magnitud; el más importante pertenece al “Proyecto Meconio”, que analizó muestras de meconio recogidas entre los años 2002 y 2004 del Hospital del Mar en Barcelona, pero se centró más en los análisis de drogas de abuso que en el del tabaco, por considerar dichos consumos, aunque más esporádicos entre la población general, más perjudiciales para el feto. Pese a esto, conocemos datos de consumo de tabaco en la población general y en determinados estratos poblacionales a través de los informes y las encuestas del Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías. Observando las diferencias en el consumo de tabaco por sexos, los hombres muestran un porcentaje de consumo superior al de las mujeres (44,2% y 37,2%, respectivamente, como prevalencia de consumo en el último año; 33,6% y 28,0%, respectivamente, como prevalencia de consumo diario) [1]. De estos datos se puede extrapolar que los porcentajes varían considerablemente en función de los factores de periodicidad de consumo a tener en cuenta (consumo alguna vez en la vida, consumo en los últimos 12 meses, consumo en los últimos 30 días, consumo diario, etc). Desde el punto de vista de este estudio, el consumo que más nos interesa es el crónico, puesto que tendrá efectos más nocivos sobre el feto que el consumo esporádico, y porque seremos capaces de detectarlo con mayor facilidad. El consumo de tabaco diario está más extendido entre los hombres que entre las mujeres en todos los tramos de edad, pero cabe resaltar que las mujeres muestran su mayor prevalencia de consumo en el tramo comprendido entre los 45 y 54 años (35,2%), seguido de cerca por el comprendido entre los 25 y 34 años (34,2%) [1]. Éste último intervalo coincide con las edades en las que se producen las mayores tasas de fecundidad (según los últimos

registros del INE, año 2014), tanto estatales como a nivel de Galicia (30-35 años) [10]. Comparando la percepción de riesgo para distintas sustancias psicoactivas, el consumo diario de una cajetilla de tabaco es considerado como una de las conductas menos nocivas para la salud [1]. De hecho, el consumo diario medio de cigarrillos, en la población de entre 15 y 64 años en el último mes, es de 14,6 cigarrillos en hombres y de 12,3 cigarrillos en mujeres [1].

Ahondando en los datos sobre el consumo de tabaco en nuestro país, destaca el hecho de que es la sustancia psicoactiva de inicio de consumo más temprano en la población de 15-64 años (16,4 años) y cuya prevalencia de consumo se mantiene en porcentajes considerables en todos los rangos de edad [1].

Por todo ello y considerando que las mujeres en edad fértil son aquellas cuyas edades se sitúan entre los 15 y los 49 años, se constata que es en este rango de edades donde la prevalencia de consumo diario de tabaco es mayor, si lo comparamos con los rangos inmediatamente inferiores y superiores. En cuanto a la prevalencia de consumo de tabaco diario por Comunidades Autónomas, Galicia (28,1%) se encuentra por debajo de la media estatal (30,8%) como se observa en la Figura 3 [1].

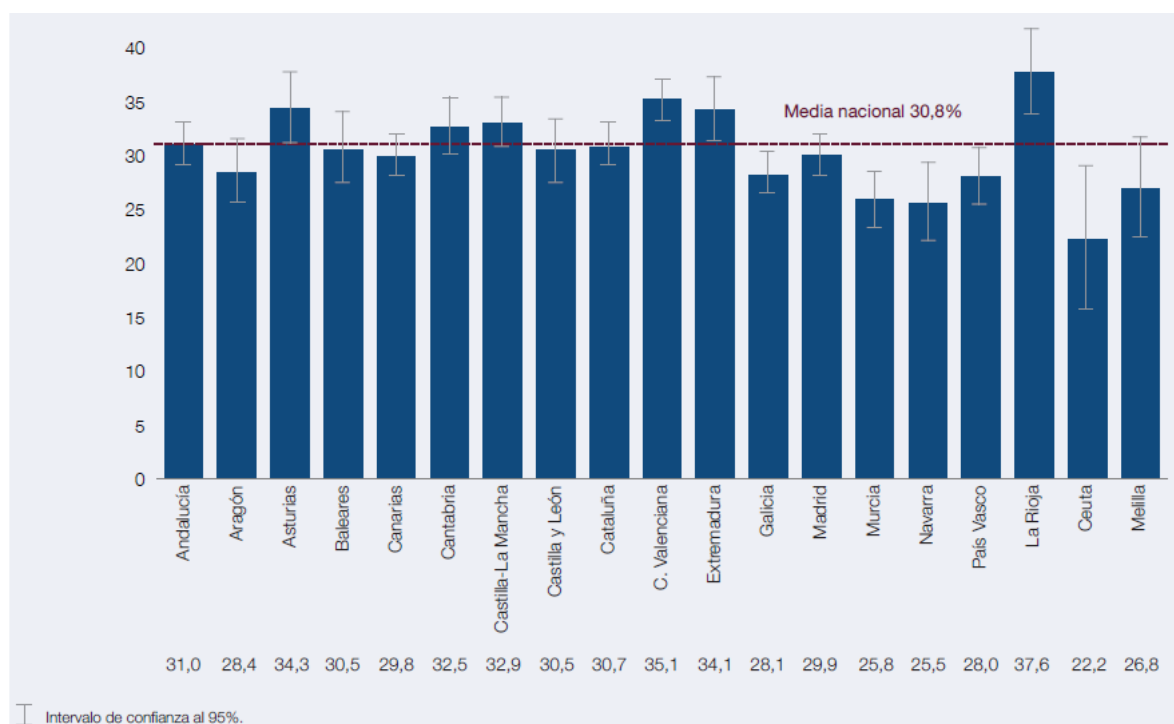


Figura 3. Prevalencia de consumo (en porcentajes) de tabaco diario en los últimos 30 días entre la población de 15-64 años según Comunidad/Ciudad Autónoma. España, 2013 (Tomada de [1]).

Si bien es cierto que se observa un descenso importante en los hábitos tabáquicos en nuestro país, sobre todo en el caso de las mujeres, desde que se iniciaron las encuestas EDADES en el año 1995, cabe resaltar el hecho alarmante de que el consumo de tabaco está volviendo a incrementarse con respecto a los últimos años. Además el tabaco sigue siendo considerado por la población general como un “vicio” pero no una “droga” y, por tanto, aunque se conocen sus efectos perjudiciales, su consumo no ofrece la misma sensación de temor que el del resto de drogas.

1.2. Exposición al humo del tabaco durante el embarazo: historia, tipos de exposición y efectos de la misma sobre la madre y el feto

Los efectos nocivos del tabaco sobre la salud se empezaron a investigar en profundidad a mediados del siglo pasado, cuando su consumo alcanzó su máxima extensión entre la población, abarcando tanto a hombres como mujeres desde edades muy tempranas. En realidad, el tabaco no constituyó un problema de salud importante hasta la llegada de las llamadas Revoluciones Industriales (mediados del siglo XVIII-principios del siglo XX), momento en el que comenzó su producción, publicidad y consumo masivo. Por ello, fue durante el siglo pasado cuando se comenzaron a realizar más estudios médicos acerca de su consumo, demostrando los perjuicios que provoca sobre la salud. Aun así no fue hasta la década de los 90 cuando se empezó a dar importancia real desde las instituciones al efecto nocivo del tabaco, aunque, debido a la falta de estudios más exhaustivos y al gran poder económico de las tabacaleras, no se tomaron demasiadas medidas al respecto. Se tuvo que esperar a la llegada del nuevo siglo para observar una mayor preocupación en la población general y mayores esfuerzos desde instituciones como la OMS y la UE para reducir su consumo, acrecentados en parte por los resultados más que convincentes de un gran número de estudios realizados en las últimas décadas, que confirman inequívocamente la relación entre el consumo activo y pasivo de tabaco y distintas morbilidades y mortalidades, y por el coste sanitario que ello acarrea [11-13].

En la actualidad, por tanto, está más que demostrado que el consumo de tabaco (ya sea de forma activa o como resultado de una exposición pasiva), es perjudicial para la

salud, siendo el causante de numerosas y variadas patologías: desde distintos tipos de cáncer (principalmente de pulmón, en el 85% de los casos; pero también de laringe, esófago, riñón, vejiga, etc.) a enfermedades respiratorias (el 75% de las bronquitis crónicas, asma, enfisema pulmonar), así como enfermedades cardiovasculares (causa el 25% de las cardiopatías isquémicas). En resumen, se estima que el tabaco es el responsable de aproximadamente el 30% de las muertes por cáncer, del 80% de las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC) y del 20% de las defunciones por enfermedades de tipo cardiovascular [12,14]. Además, dejando a un lado las morbilidades crónicas que provoca, el número de muertes anuales en nuestro país atribuibles a su consumo se sitúa en 50.000, predominando los hombres, aunque esta tendencia está cambiando y la mortalidad de éstos se encuentra en descenso mientras que la de las mujeres ha comenzado a ascender. Yendo más allá, estudios recientes pronostican que el 50% de los fumadores habituales morirán a causa del tabaco [15].

Por tanto, si el consumo o exposición al humo del tabaco es perjudicial para la población en general, lo será tanto o más si cabe para los llamados “grupos de riesgo”, como niños y embarazadas. Sin embargo, como ya se ha mencionado con anterioridad, en este ámbito tiene lugar la paradoja de que, si bien estas poblaciones pueden padecer unos riesgos mayores de morbilidad y mortalidad debido a la exposición a esta sustancia, los datos sobre dicha exposición (obtenidos tanto a partir de encuestas como de estudios y ensayo clínicos) son menos numerosos que para la población general, sobre todo en nuestro país. Aun así y debido a que, en el caso concreto de las embarazadas, éstas han estado expuestas y siguen estando expuestas al humo del tabaco de forma importante, conocemos algunos de los efectos perjudiciales que ello les acarrea. Ya en el año 1935, Sontag y Wallace observaron algunos de los efectos producidos por el consumo de tabaco materno en el feto, como el aumento del ritmo cardíaco, con lo que concluyeron que probablemente tuviera lugar el paso de nicotina de la madre al feto [16]. No obstante, los primeros estudios sobre los que se tiene constancia en este campo se llevaron a cabo en 1868, debido a la frecuencia de abortos y muertes prematuras de los hijos de las trabajadoras en fábricas de tabaco europeas o en otras profesiones relacionadas con el tabaco [16]. Durante los sucesivos años, varios

investigadores mostraron su preocupación por este hecho, hasta que descubrieron la relación inequívoca y más demostrada hasta el momento que se establece entre el consumo de tabaco materno durante el embarazo y el feto: el retraso en el crecimiento fetal y, más concretamente, una disminución significativa en el peso del recién nacido [16-18]. De todo esto se deriva que, en la actualidad, la exposición al humo del tabaco por parte de las mujeres embarazadas y sus efectos sobre ellas y sus futuros bebés se erija como uno de los problemas más importantes a los que se enfrentan los tocólogos.

En el estudio de la exposición materno-fetal al tabaco hay que tener en cuenta, como ya se ha mencionado, tanto el consumo activo de tabaco como el pasivo. Cuando un individuo fuma un cigarrillo, en cada calada se crean dos tipos de “corrientes” de humo: la primaria o principal, que es inhalada por el fumador, penetrando profundamente hasta los alveolos pulmonares; y la secundaria o lateral, formada por el humo desprendido entre las caladas y que se emite por el otro extremo del cigarrillo en combustión. Esta última corriente constituye más del 75% del humo total producido y es de mayor duración que la principal (10 minutos frente a 20-30 segundos de caladas activas, aproximadamente) y provoca una mayor contaminación del ambiente, ya que, al producirse mediante una combustión más incompleta (depende de la porción más interna del cigarrillo y, por tanto, en esa zona hay menos oxígeno y más agua que en la más externa, donde se produce la columna de humo principal) y a menor temperatura (las temperaturas oscilan entre 900°C en una calada, donde se produce el humo principal, a 400-600°C entre calada y calada, donde se produce el secundario), posee un contenido en sustancias tóxicas similar al de la corriente primaria. Además, la mayoría de estas sustancias (HAPs, nitrosaminas, monóxido de carbono, nicotina, amoníaco, benceno, tolueno, ...) se encuentran en mayor concentración y con un tamaño de partícula menor en la corriente lateral (lo que favorece que llegue a las vías respiratorias del fumador pasivo, y del propio fumador activo, con gran facilidad) [16,19,20]. En resumen, numerosos estudios han constatado que el humo lateral desprendido por los cigarrillos es entre 2 y 6 veces más tóxico y cancerígeno que el principal (inhalado en su mayor parte por el fumador), dejando así reflejado, de paso, un hecho invisible hace

pocas décadas: los fumadores pasivos están expuestos también a riesgos muy altos al permanecer en lugares expuestos al humo del tabaco [19-21].

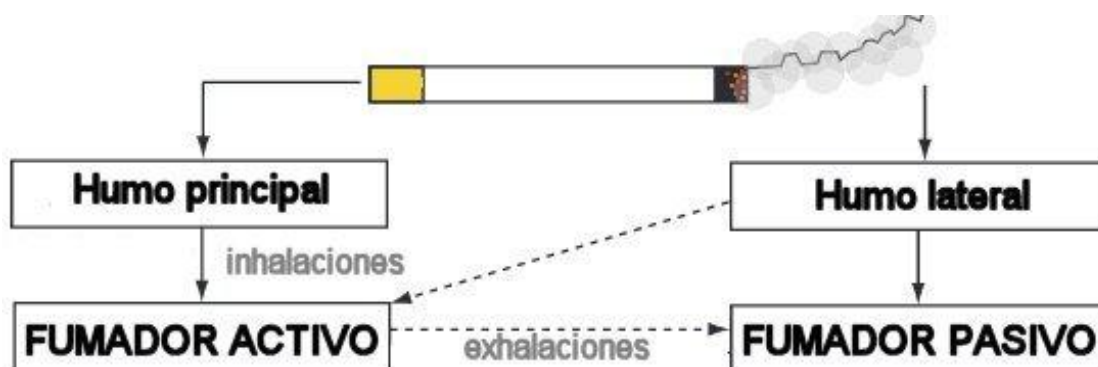


Figura 4. Esquema de las corrientes de humo que se producen con la combustión de un cigarrillo y de cómo éstas alcanzan a los distintos tipos de fumadores.

El humo de tabaco que hay en el ambiente (Humo de Tabaco Ambiental, HTA o ETS en inglés) es el causante principal de la mayoría de las patologías relacionadas con esta sustancia y proviene, por tanto, de una mezcla del aire con la corriente lateral que se desprende espontáneamente de la combustión del cigarrillo y de la parte exhalada por el fumador en el acto de fumar (Figura 4). En este humo ambiental se encuentran muchos compuestos clasificados como carcinógenos y sustancias tóxicas, que causan efectos nocivos en los fumadores pasivos (y, por supuesto, también en los activos). En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de los principales compuestos químicos identificados en el humo del tabaco y en qué proporciones se encuentran aproximadamente en la corriente principal. Se trata de valores muy variables, sobre todo en el caso del humo principal, que depende mucho de la frecuencia y de la intensidad de las caladas, así como del tipo de cigarrillo y su estructura.

Tabla 1. Componentes principales del humo del tabaco [16,20].

| Componentes principales en el humo del tabaco | | |
|---|--|---|
| Grupo | Ejemplos de componentes | Cantidad (en la corriente ppal o partículas/cigarrillo) |
| Alcaloides del tabaco | Nicotina | 100 – 2500 µg |
| | Cotinina | 9 – 57 µg |
| | Nornicotina | 30 – 80 µg |
| Nitrosaminas | N-Nitrosodimetilamina (NDMA)* | 13 ng* |
| | N-Nitrosornicotina (NNN) | 238 ng |
| Gases | CO | 16,2 mg |
| | CO ₂ | 68,1 mg |
| | Óxidos de nitrógeno | 350 µg |
| | Cianuro de hidrógeno (HCN) | 100 µg |
| Metales | Cu | 190 ng |
| | Cd | 120 ng |
| | Hg | 4 ng |
| | Ni | 80 ng |
| Hidrocarburos tóxicos | C ₂ – C ₆ | 2,5 mg |
| | Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs; PAHs en inglés) | 317 – 442 ng |

*La NDMA pertenece al grupo de nitrosaminas volátiles, las cuales se encuentran en concentraciones muy pequeñas en la corriente de humo principal pero en concentraciones altas en la corriente de humo secundaria (680 ng).

De todo lo anterior, se puede extraer que las mujeres embarazadas, ya sean fumadoras activas o pasivas, se verán expuestas a un gran número de compuestos perjudiciales, tanto para su propia salud como para la de su feto. Puesto que las mujeres embarazadas se encuentran en un estado fisiológico especial, debemos tener en cuenta los efectos de la exposición al tabaco tanto sobre la madre gestante, como sobre el propio curso del embarazo y del parto, y por supuesto sobre el feto y el recién nacido. De hecho, el tabaquismo ya puede provocar problemas en el embarazo incluso antes de que éste se produzca (ya que causa, por ejemplo, alteraciones en la fertilidad) y se ha demostrado que también puede afectar al futuro niño y adulto nacidos de padres fumadores (es decir, la exposición al HTA puede provocar patologías en el feto no

visibles o detectables hasta edades adultas). En la Tabla 2 se resumen los principales y más demostrados efectos del consumo de tabaco en las distintas situaciones mencionadas.

Tabla 2: Principales efectos del consumo de tabaco durante el embarazo [22].

| PERÍODO | EFEECTO |
|-----------------------------------|--|
| Mujeres en edad fértil | Problemas de fertilidad (en hombres y mujeres) Dismenorrea |
| Mujeres embarazadas | Empeoramiento de los síntomas del embarazo Disminución de la inmunidad Incremento de la susceptibilidad a infecciones vaginales |
| Curso del embarazo y parto | Abortos espontáneos (por ejemplo, debidos a embarazos ectópicos o extrauterinos) Rotura prematura de membranas Patologías placentarias (cambios morfológicos, cambios fisiológicos – p.ej. en la absorción de nutrientes y en la vascularización – insuficiencia, necrosis, inflamación, placenta previa, desprendimiento prematuro, rotura del cordón umbilical, ...) Disminución de la inmunidad e incremento de la susceptibilidad a infecciones vaginales |
| Feto/ Recién nacido | Menor peso al nacer (150-300 g) que los no expuestos Malnutrición e hipoxia fetal Presión arterial elevada y ritmo cardíaco alterado (acelerado/ ralentizado) Retraso en el desarrollo pulmonar Cambios en el metabolismo de proteínas |
| Niño/Adulto | Síndrome de muerte súbita del lactante (SMSL) Reflejo de succión y audición disminuidos Dificultades de aprendizaje y menor inteligencia Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) Alteración de las proporciones entre la masa corporal y el crecimiento del niño Enfermedades respiratorias (asma bronquial, bronquitis, neumonía, sinusitis y sibilancias) Mayor riesgo de comportamientos adictivos en el adulto (p.ej. fumar) Aumento del riesgo de padecer cáncer |

1.3. Determinación del consumo de tabaco durante el embarazo

El método más frecuentemente empleado para documentar el consumo o exposición al tabaco durante el embarazo es, como ya se ha mencionado, la entrevista materna y, como también ya se ha resaltado, numerosos estudios han constatado que no es un método fiable.

La otra forma de documentar esta exposición se basa en la aplicación de métodos analíticos a la determinación de biomarcadores (componentes del tabaco y/o sus respectivos metabolitos) presentes en muestras biológicas de la madre, del recién

nacido, o incluso recogidas en el momento del parto. Este es un método mucho más objetivo y fiable, ya que las matrices biológicas procedentes del recién nacido y de la madre son, en distintos grados, los lugares por los que circularon e incluso se acumularon las sustancias a las que el feto pudo estar expuesto en el útero. Por lo tanto, a la hora de identificar a los recién nacidos en situación de riesgo para estimar si necesitan algún tratamiento, es importante realizar una evaluación precisa de esta exposición mediante el análisis de las diferentes matrices.

Las muestras empleadas con más frecuencia son la orina y el pelo de la madre, y la orina, el pelo y el meconio del recién nacido. Cada matriz biológica tiene ventajas y limitaciones, dependiendo de la facilidad de la obtención de la muestra, las diferentes ventanas de detección, y la sensibilidad y especificidad de la misma, así como de las sustancias a detectar en concreto, y de su interacción con la matriz [23,24].

De este modo, vamos a dividir las muestras en tres grupos:

1.3.1. Muestras procedentes de la madre

Las ventajas de este tipo de muestras son que, si la madre da su consentimiento, suelen ser muestras de fácil recogida y cantidad suficiente. Sin embargo, no aportan datos directos sobre la exposición intrauterina del feto a las sustancias, sólo informan sobre el consumo de la madre pero no en qué medida éste puede afectar o no al feto y en qué cantidad y “forma” le llegan las sustancias [23]. En la Tabla 3 se resumen algunas de las características de las muestras maternas más analizadas.

Tabla 3. Principales características de las muestras maternas [22,23].

| Muestra | Obtención | Cantidad | Ventana de detección |
|---------------|--|------------|---------------------------------|
| Orina | Fácil / no invasiva | Grande | Corta (1-5 días) |
| Pelo | Fácil / no invasiva | Grande | Amplia: consumo crónico (meses) |
| Saliva | Fácil / no invasiva | Suficiente | Muy corta (horas) |
| Sangre | Invasiva | Grande | Corta (horas-3 días) |
| Sudor | No invasiva pero dependiente de la producción de sudor | Irregular | Grande (1 semana) |
| Leche materna | Fácil / no invasiva | Pequeña | Muy corta (horas) |

La detección de sustancias en pelo materno ha sido considerado el “gold standard” para la evaluación del consumo crónico de xenobióticos durante el embarazo, ya que

posee una amplia ventana de detección (meses). Sin embargo, como todas las muestras procedentes de la madre, da una estimación directa de la exposición materna a la droga, pero sólo una estimación indirecta de la que llegó al feto [23].

1.3.2. Muestras procedentes del feto o recién nacido

La principal ventaja que presenta el análisis de este tipo de muestras es que son las que aportan una información más directa de cómo el consumo o exposición de la madre al humo del tabaco u otras sustancias puede afectar al feto. La orina, el meconio y el cordón umbilical son considerados muestras de desecho, por lo que los padres suelen permitir su recolección; no pasa lo mismo en el caso del pelo, donde se muestran más reticentes, ya sea por motivos religiosos o estéticos. La orina del recién nacido puede ser difícil de recolectar y su ventana de detección no aporta demasiada información. El meconio es la muestra más empleada en la actualidad, debido a que su recolección es no invasiva, se obtiene una gran cantidad de muestra en la mayoría de los casos y su ventana de detección es amplia, ya que se empieza a formar a partir de las semanas 12-16 del embarazo y se va acumulando hasta el momento del parto. No obstante también presenta ciertas desventajas, como que puede perderse durante el parto o ser expulsado hasta cinco días después del alumbramiento, cuando el recién nacido ya no se encuentre en el hospital y, aunque aún siga en el hospital, el análisis de la matriz se habrá retrasado. Otra muestra empleada en varios estudios ha sido la sangre del cordón umbilical, pero su corta ventana de detección, la pequeña cantidad de muestra que se puede obtener y las bajas concentraciones de las sustancias que se detectan en ella no hacen que sea una matriz ideal para este análisis [5,22,24].

De este modo, el tejido del cordón umbilical está empezando a estudiarse como una posible muestra alternativa para la detección de la exposición del feto a diferentes sustancias, si bien es cierto que se han realizado muy pocos estudios con este tipo de muestra y que, por lo tanto, no es una matriz estudiada en profundidad. Aun así, sus ventajas (que se considere una sustancia de desecho y que se pueda obtener en el momento del parto de forma no invasiva y en grandes cantidades, además de que sea una muestra de tipo únicamente fetal) hacen que su estudio presente un elevado interés. En cuanto a su ventana de detección, existe controversia acerca de su

duración, por lo que con este trabajo se ha intentado determinar un valor más objetivo. La Tabla 4 resume las principales características de las muestras fetales [22,24,25].

Tabla 4. Principales características de las muestras fetales [22,24].

| Muestra | Obtención | Cantidad | Ventana de detección |
|-----------------------------|----------------------|--------------|----------------------------------|
| Orina | Difícil /no invasiva | Grande | Corta (1-5 días) |
| Pelo | Difícil /no invasiva | Pequeña/Nula | Amplia: consumo crónico (meses) |
| Uñas | Difícil /no invasiva | Pequeña | Amplia: consumo crónico (meses) |
| Meconio | Fácil / no invasiva | Grande | Amplia: consumo 2º-3er trimestre |
| Sangre del cordón umbilical | Fácil / no invasiva | Pequeña | Corta (1-3 días) |
| Cordón umbilical | No invasiva | Grande | ¿? |

1.3.3. Muestras procedentes de ambos

En este grupo se incluyen el líquido amniótico y la placenta. El primero es muy poco empleado debido a la alta invasividad de su extracción, que habría que realizar durante el embarazo y en la que se podría poner en peligro al feto, dejando su empleo relegado para el diagnóstico de determinadas enfermedades. Su ventana de detección es amplia (meses), aunque la cantidad de muestra disponible sería pequeña.

Por otro lado, en la actualidad se están realizando estudios con placenta como muestra biológica (ha cobrado más relevancia como muestra que el tejido del cordón umbilical, por lo que se posee más información sobre ella como matriz). Aunque la placenta se forma en las primeras semanas del embarazo, estudios recientes demuestran que su ventana de detección es corta (de unas horas) [22,23]. Sus principales ventajas son, como en el caso del cordón umbilical, que se considera material de desecho, que se puede obtener ya en el momento del parto y de forma no invasiva y que se obtiene una gran cantidad de muestra.

1.4. La placenta y el cordón umbilical como matrices biológicas. Fisiología y mecanismos de incorporación de sustancias externas

La placenta es el órgano que funciona como nexo entre el feto y la madre gestante, dotando a éste de las funciones que no puede ejercer por sí mismo sin ayuda (respiración, nutrición y excreción). Por su parte, el cordón umbilical es una estructura tubular, de medio metro de largo, formada por dos arterias y una vena rodeadas por la llamada gelatina de Wharton, permitiendo así el flujo sanguíneo entre madre y feto, al conectarse éste con el feto y la placenta [26].

Durante muchos años se ha discutido sobre la función real de la placenta; algunos autores afirmaban que jugaba un papel predominantemente filtrante de las sustancias mientras que otros sostenían que actuaba como una verdadera “barrera placentaria”, protegiendo al feto del paso de muchas sustancias. A día de hoy, se puede afirmar que la situación real es un compendio de las dos anteriores: la placenta es un filtro y a la vez un órgano metabólico activo, predominando cada una de ambas funciones dependiendo de la etapa de la gestación. De este modo, podemos hablar de una “evolución funcional de la placenta”: a lo largo del embarazo, la placenta evoluciona fisiológicamente, pasando de ser metabólicamente más activa al inicio de la gestación, a adaptarse a los procesos de filtración al final de la misma. En este punto cabe resaltar que, si bien es cierto que la placenta sirve como barrera ante el paso de ciertos xenobióticos al feto, sin impedir, sin embargo, el paso de anticuerpos; el paso de nutrientes a través de ella parece ser mucho más selectivo que el paso de las drogas, situación explicable quizás por el hecho de que sólo es capaz de regular el paso de sustancias fisiológicas y no el de elementos desconocidos y porque, aunque posee una importante capacidad metabólica, ésta no es comparable a la del hígado, por lo que no eliminará tan eficazmente los xenobióticos [27,28].

El paso de la mayoría de las sustancias a través de la placenta no está todavía perfectamente dilucidado, aunque sí se sabe que los cuatro mecanismos principales de transferencia placentaria son la difusión (empleada por los gases, el agua, algunos electrolitos, etc.), la difusión facilitada (empleada por la glucosa), el transporte activo (empleado por los aminoácidos, vitaminas hidrosolubles, calcio, hierro, etc.) y la

pinocitosis/fagocitosis (empleada para el transporte de moléculas grandes). Muchas de las sustancias que atraviesan la placenta quedan retenidas en ella, siendo después devueltas a la circulación materna de forma gradual, o metabolizadas para convertirlas en productos de excreción. En este aspecto, la placenta actúa como un “hígado transitorio”-y posee un gran número de enzimas, muchas comunes a las hepáticas. Así, no solo metaboliza ciertas sustancias, sino que también ejerce otras funciones del hígado, como la síntesis de proteínas o el almacenamiento de ciertos nutrientes como el hierro (muy necesario para formar la hemoglobina fetal), sobre todo en los meses centrales de la gestación, cuando el hígado fetal todavía no ha conseguido alcanzar su desarrollo funcional. Asociado a esta actividad metabólica, la placenta posee un elevado gasto de oxígeno, también debido a que actúa como un pulmón para el feto. Por lo tanto, el paso de oxígeno a través de la placenta es fundamental para el correcto desarrollo fetal, y su aporte al feto se produce en grandes cantidades gracias a la hemoglobina fetal (Hb F), que posee una mayor afinidad por él que la hemoglobina de los adultos (Hb A) [16,27,28].

En relación al paso de la nicotina a través de la placenta, se puede afirmar que éste tiene lugar, puesto que se han realizado estudios donde se han detectado nicotina y cotinina en el cordón umbilical y en la placenta tras la administración de tabaco a mujeres embarazadas, se han monitorizado sus efectos en el feto (y se han obtenido muestras a partir de él en las que estaban presentes la nicotina y/o la cotinina) y se ha medido dicho transporte en cotiledones aislados de placentas humanas in Vitro [16]. La nicotina (y la mayoría de los componentes del tabaco), se absorben en su mayor parte a través del sistema respiratorio, tanto en fumadores pasivos como activos. En ambos grupos también tiene lugar una absorción a través de la piel y, en el caso de los fumadores, ésta también se puede producir a nivel de la mucosa bucal y del tracto gastrointestinal (al ser tragados con la saliva). Por estas tres vías (respiratoria, dérmica y gastrointestinal) es como también pueden llegar estas sustancias al feto, como se puede apreciar en el diagrama de la Figura 5.

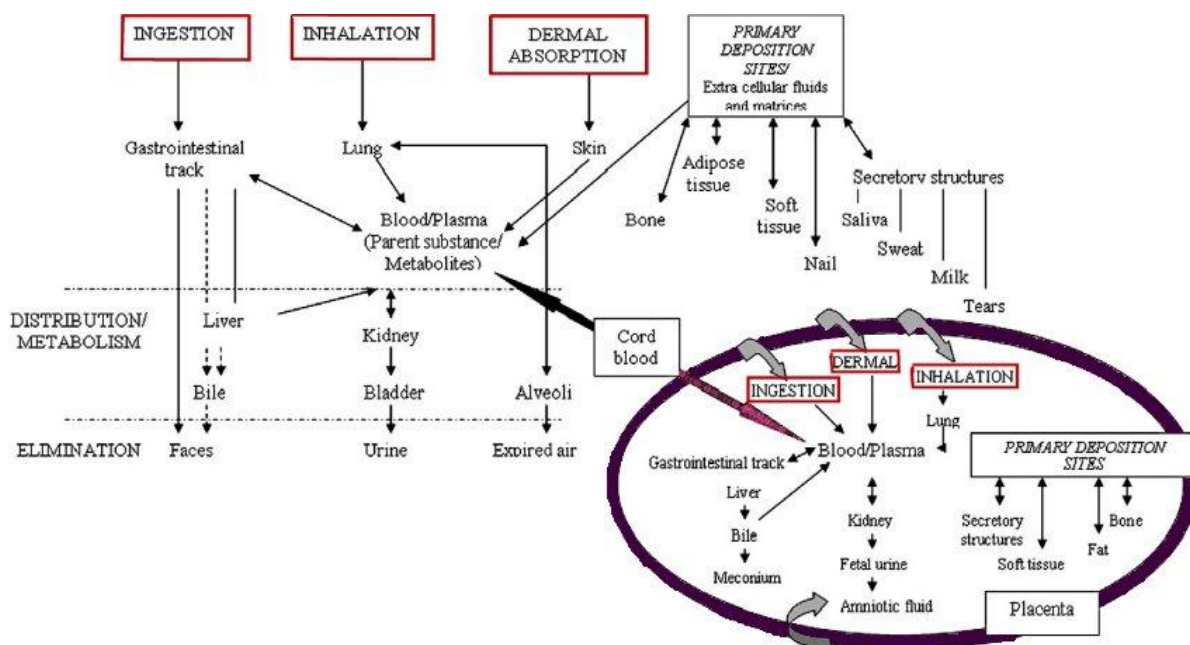


Figura 5: Interrelación entre la exposición a sustancias de abuso materna y fetal y la deposición de las mismas en ambos (Modificado de [22]).

El paso de la nicotina a través de la placenta y su llegada al feto provoca efectos indeseados, como ya se ha resaltado. A nivel placentario, la nicotina aumenta la resistencia vascular y reduce el flujo de sangre uterino (efectos mediados por la liberación de catecolaminas que provoca). Además, durante el último trimestre del embarazo, la nicotina provoca un descenso del ritmo cardíaco fetal y reduce sus movimientos respiratorios, ambos síntomas de hipoxia fetal [16,22,27,28].

La interacción de los componentes del tabaco y la placenta provoca varias situaciones de relevancia toxicológica. Por un lado, la placenta metaboliza la nicotina y otros componentes formando sustancias tóxicas como las nitrosaminas y convierte hidrocarburos aromáticos policíclicos en metabolitos mutagénicos. Por otro lado, estos compuestos inducen enzimas placentarias (se ha comprobado que determinadas enzimas que metabolizan xenobióticos tanto en hígado como en placenta, se ven incrementadas en los tejidos placentarios, y en el hígado y pulmones fetales de fetos de madres fumadoras). Por último, los componentes del humo del tabaco producen una serie de efectos en la placenta a nivel de los intercambios de nutrientes muy

importantes: la nicotina deprime la captación de aminoácidos por las células placentarias (lo que explicaría hechos como el bajo peso de los recién nacidos de madres fumadoras) y la nicotina, el monóxido de carbono, el cianuro de hidrógeno y los óxidos de nitrógeno interfieren en la cesión de oxígeno a los tejidos fetales, causando hipoxia fetal mediante distintos mecanismos (por ejemplo, el CO desplaza al O₂ de su unión a la Hb y forma carboxihemoglobina, no capacitada para llevar a cabo funciones respiratorias) [16,17,28].

Por último, un dato a destacar es el hecho de que la nicotina posee tal facilidad para atravesar la placenta que las concentraciones en los tejidos fetales pueden incluso ser superiores a las maternas [25].

1.5. Técnica experimental

1.5.1. La nicotina y sus metabolitos

Se estima que en un cigarrillo pueden coexistir más de 4000 compuestos distintos, la mayoría de ellos englobados en las familias descritas en la Tabla 1. Los alcaloides del tabaco se erigen, de entre todos ellos, como los componentes principales en todos los productos derivados del tabaco, tanto por su proporción como por su actividad. La nicotina es el alcaloide más abundante, representando aproximadamente el 98% del total de los alcaloides presentes (más de una veintena). A ella se le atribuyen los efectos farmacológicos principales del tabaco, así como su gran potencial adictivo; de hecho, la OMS reconoce el síndrome de dependencia del tabaco debido a la nicotina como una enfermedad, y el Colegio Real de Médicos británico sostiene que dicha dependencia «*es una forma grave de drogadicción que, en general, supera a cualquier otra*» [29]. Este efecto adictivo de la nicotina se debe a que estimula los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) de las neuronas del *nucleus accumbens* del prosencéfalo, debido a que es un análogo de la acetilcolina, provocando la liberación de grandes cantidades de dopamina y, con ello, proporcionando al consumidor una sensación de “recompensa”, incentivada, más si cabe, por la rapidez con que se notan estos efectos: tras inhalar el humo del tabaco, la concentración de nicotina en sangre

aumenta rápidamente, se extiende extensamente a todos los tejidos corporales y, en 10-20 segundos, llega una gran cantidad al cerebro, con una velocidad aún mayor que si se inyectara por vía intravenosa [16,20]. Además, el consumo habitual de nicotina produce cambios funcionales en diversas zonas del cerebro, provocando a la larga un descenso en los niveles de dopamina ante la ausencia de nicotina en el SNC, creando así en el fumador una necesidad de inhalar más nicotina para volver a incrementar dichos niveles.

Tras su absorción, la nicotina es metabolizada rápidamente en el hígado (y, en menor medida, en los pulmones), dando lugar a varios metabolitos. La principal vía metabólica en la que se ve implicada la nicotina en el efecto de primer paso es la C-oxidación, dando lugar a la cotinina, su metabolito mayoritario (el 70-80% de la nicotina se convierte en cotinina). Ésta, a su vez, también sufre reacciones metabólicas, dando lugar a un gran número de metabolitos, entre los que destaca la Trans-3'-OH-cotinina, resultado de una hidroxilación de la cotinina [16,20,22]. El presente estudio, se centra en estas tres moléculas debido a que estudios previos han demostrado que son los alcaloides (y derivados) que se encuentran en mayores proporciones en las matrices biológicas que se van a emplear (y, en general, en casi todas las muestras biológicas analizables). Otro dato interesante que se ha obtenido de estos estudios es que la cotinina se ha convertido en el biomarcador por excelencia del consumo de tabaco, desbancando a la nicotina, debido a que es un marcador que aporta información acerca del consumo cualitativo y cuantitativo, su vida media es más larga (18-20h frente a 2h de la nicotina), sus niveles se mantienen más constantes en el tiempo y está presente en sangre en concentraciones mucho mayores que la nicotina [16,30]. La Figura 6 ilustra el metabolismo de la nicotina.



Figura 6. Metabolismo de la Nicotina (Modificado de [16,21])

1.5.2. Extracción en Fase Sólida (SPE)

Se trata de una técnica de preparación de muestras biológicas antes de su análisis, en este caso por LC-MS/MS, basada en la retención selectiva de analitos de una muestra líquida sobre un adsorbente sólido. Su eficiencia es mayor que la de la extracción líquido/líquido, y permite reducir el empleo de disolventes y el tiempo de preparación. Los cartuchos de extracción se escogen en función de las propiedades físico-químicas de los analitos que se quieren extraer, ya que los hay con distintos tipos de relleno o adsorbentes (de fase reversa, intercambio aniónico, intercambio catiónico, etc.). En este caso, se han utilizado cartuchos de intercambio catiónico, que retienen a los analitos cargados positivamente mediante fuerzas electrostáticas. Para que esto ocurra, el pH al que se acondiciona la muestra debe ser aquel en el que tanto los analitos de interés como los grupos funcionales de la columna se hallen cargados. Además, la elución de los analitos se lleva a cabo mediante una solución con un pH tal que neutralice los grupos funcionales del compuesto o los del adsorbente, para interrumpir la fuerza electrostática responsable de sus uniones [31].

Los distintos pasos de la extracción en fase sólida son (Figura 7):

- Acondicionamiento de la columna: esta acción tiene como objetivo la activación del adsorbente y de los grupos funcionales que contiene, que serán los responsables de retener los analitos de interés.
- Carga de la muestra: se hace pasar la muestra por el cartucho. Los compuestos que queremos detectar serán retenidos por éste y los demás compuestos presentes en la muestra, que no son de interés para el análisis, podrán pasar por el cartucho sin ser retenidos o serán retenidos con mayor o menor afinidad en la superficie del adsorbente.
- Lavado: la finalidad de este paso es la de eliminar posibles interferentes de la matriz, manteniendo en el lecho del adsorbente, retenidos, los analitos de interés.
- Secado de las columnas: para eliminar lo máximo posible los restos del disolvente de lavado presentes en el cartucho.

- Elución de los analitos: se hace pasar por el cartucho un disolvente que elimine la interacción analito-adsorbente y obtener así los compuestos de interés. El disolvente adecuado ha de tener la máxima interacción con el analito y una interacción mínima con las demás impurezas, permitiendo que éstas continúen retenidas en el lecho del adsorbente.

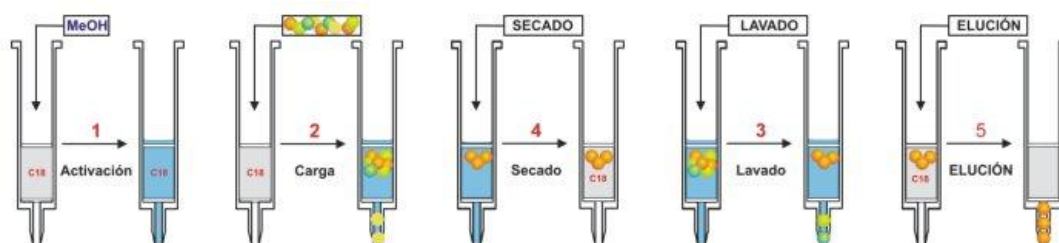


Figura 7. Pasos de la extracción en Fase sólida.

1.5.3. Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS)

El acoplamiento de un detector de espectrometría de masas a un sistema de separación cromatográfica constituye una herramienta que permite que se resuelvan con las suficientes garantías, los problemas de identificación y cuantificación que habitualmente les son planteados a los toxicólogos. Se trata de una técnica adecuada para el análisis de sustancias polares, de peso molecular elevado y termolábiles, sin necesidad de realizar una derivatización previa al análisis de las mismas, lo que constituye una ventaja respecto al análisis mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), que sí suele requerir procesos de derivatización [32].

Como su propio nombre indica, la Cromatografía Líquida acoplada a la Espectrometría de Masas surge por el acoplamiento de dos técnicas: la cromatografía líquida y la espectrometría de masas. La principal limitación que surgió a la hora de poner en práctica dicho acoplamiento fue que los compuestos procedentes del cromatógrafo de líquidos debían ser evaporados y posteriormente ionizados (evitando la degradación térmica) para poder ser detectados seguidamente mediante el espectrómetro de masas. Dicho problema se solucionó años más tarde con el

desarrollo de las interfases de ionización a presión atmosférica (API), siendo actualmente las más utilizadas el electrospray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI) [33].

La cromatografía líquida es una técnica de separación en la cual los componentes de la muestra que se quieren separar se distribuyen según su afinidad entre una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Durante el desarrollo del cromatograma, la fase móvil arrastra las moléculas de la muestra a través de la fase estacionaria. Los componentes que presenten mayor afinidad por la fase estacionaria serán retenidos con mayor fuerza por ella y se moverán lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, aquellos componentes que se unan débilmente a la fase estacionaria se moverán más rápido con el flujo de la fase móvil, al romperse las uniones con la fase sólida con mayor facilidad, liberándose antes los compuestos. Como consecuencia de estas diferencias, los compuestos presentarán distintos tiempos de retención, lo que permitirá separarlos y analizarlos cualitativa y/o cuantitativamente. Los compuestos, una vez separados, llegarán a la interfase, donde serán evaporados e ionizados, y las moléculas resultantes serán conducidas por medio de un gradiente eléctrico y un gradiente de vacío hasta el analizador, donde serán separadas de nuevo, esta vez en función de su relación masa/carga (m/z) [34].

En este caso, se ha trabajado con la interfase ESI, que produce una ionización suave, dando lugar a moléculas predominantemente protonadas o desprotonadas, según se trabaje en modo positivo (ESI+, modo seleccionado en el presente trabajo) o en modo negativo (ESI-), respectivamente. En la GC-MS, los compuestos en estado gaseoso son ionizados aplicando un elevado voltaje, que provoca la ruptura de cada molécula en sus fragmentos característicos.

En un LC-MS simple, con un solo analizador, se puede inducir la fragmentación de la molécula aumentando el voltaje aplicado en el cono de entrada al espectrómetro de masas, antes de llegar a dicho analizador. Otra posibilidad es la utilización de varios analizadores en tándem (LC-MS/MS), que permite aumentar la especificidad y sensibilidad de la técnica: el primer analizador selecciona los iones de una determinada relación m/z (iones precursor o padre) y dichos iones se introducen en la

celda de colisión donde, debido a la aplicación de un potencial eléctrico (energía de colisión) y de un gas de colisión (argón o nitrógeno), se rompen en sus distintos fragmentos (iones producto o hijo) cuya relación m/z es medida por el segundo analizador (Figura 8) [35].

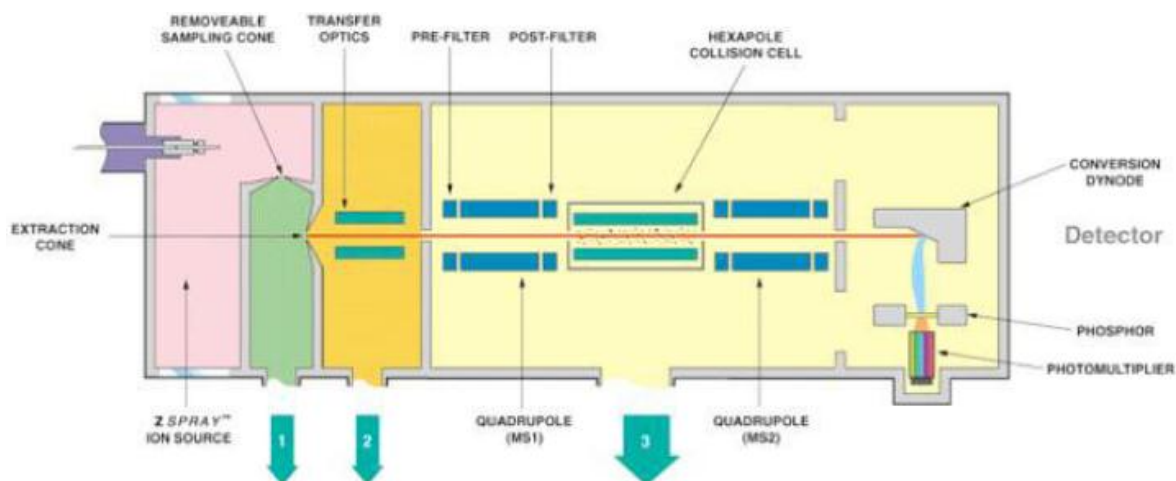


Figura 8. Esquema de un espectrómetro de masas en tándem de triple cuadrupolo (QqQ).

Distintos autores han publicado métodos analíticos para la determinación de la nicotina y sus metabolitos, en distintas matrices biológicas, incluido el meconio [25,35-39].

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El tabaco constituye, con diferencia, la droga de mayor prevalencia de consumo diario en nuestro país, consumo considerado además por la población como uno de los menos nocivos para la salud, al ser una sustancia de venta legal y al no ser considerada una “droga”. Sin embargo, los efectos nocivos del tabaco son bien conocidos en nuestra sociedad, y está demostrado que su consumo durante el embarazo es perjudicial tanto para la madre como para el feto y el correcto desarrollo del embarazo. Debido a la frecuencia de consumo y a los riesgos que implica en la salud de madre y feto, se ha estimado que el tabaco es una sustancia clave a analizar para prevenir y/o tratar posibles complicaciones derivadas de su consumo.

El desarrollo y puesta a punto de nuevos métodos analíticos constituye una necesidad permanente en el ámbito de la toxicología, ya que se trata de una ciencia que debe adaptarse a la aparición de nuevas tecnologías, sustancias de abuso y patrones de consumo para dar respuesta a problemas derivados de dichos consumo, en una sociedad cada vez más anhelante de respuestas. Debido a la escasa fiabilidad de los cuestionarios maternos, en la actualidad el método más objetivo para monitorizar el consumo de sustancias tanto legales como ilegales, se basa en el análisis de matrices biológicas. Las matrices biológicas alternativas (pelo, meconio, placenta, cordón umbilical, etc.) han ganado especial relevancia en los últimos años, debido a las ventajas que presentan con respecto a las matrices clásicas (sangre y orina). Entre los problemas de las matrices clásicas destacan que presentan una corta ventana de detección, la toma de muestra es invasiva en el caso de la sangre, la dificultad de recogida de la orina del neonato y los conflictos surgidos al relacionar las concentraciones obtenidas en sangres u orinas maternas con las existentes en tejidos fetales. Hasta el momento, las matrices alternativas empleadas con mayor frecuencia para monitorizar de forma objetiva el consumo de sustancias durante el embarazo han sido el pelo de la madre y del recién nacido, así como el meconio de éste último. Sin embargo, debido a las limitaciones particulares de cada una de estas matrices, como la dificultad para relacionar las concentraciones en muestras maternas con los efectos en el feto, y los problemas que suponen la recogida de cabello y orina fetales, han llevado a la búsqueda de matrices alternativas hasta ahora obviadas, que complementen y aporten nueva información

en el estudio de la exposición del feto a sustancias, y en particular al tabaco, durante el embarazo. La placenta y el cordón umbilical presentan características interesantes para poder ser empleadas para este fin, ya que pueden ser recogidos en el momento del parto, en cantidad abundante, y son considerados productos de desecho. Además, ambos permiten determinar de una manera más objetiva hasta qué punto las sustancias alcanzan al feto, ya que la placenta es el tejido determinante en el paso de las sustancias de la madre al feto, y el cordón (que es tejido fetal) es el tejido conector del feto con la placenta y un canal de paso de las sustancias al mismo. Por tanto, y debido a que se trata de muestras muy poco estudiadas, es necesario el desarrollo de métodos analíticos sensibles y específicos para explorar estas nuevas matrices como muestras biológicas válidas en la determinación de la exposición intra-útero al tabaco.

Los principales objetivos de este trabajo han sido:

- Desarrollar y validar un método analítico para la detección de la nicotina y sus principales metabolitos (cotinina e hidroxicotinina) en muestras de placenta humana.
- Desarrollar y validar un método analítico para la detección de la nicotina y sus principales metabolitos (cotinina e hidroxicotinina) en muestras de cordón umbilical humano.
- Aplicar los dos métodos desarrollados a casos reales de muestras biológicas de pacientes procedentes del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (CHUVI) y obtener resultados válidos para realizar un estudio de los casos solicitados por dicho hospital, como parte del “Proyecto Placenta”.
- Comparar los resultados obtenidos mediante el análisis de placenta frente a los obtenidos en el análisis de cordón umbilical, y a su vez comparar dichos resultados con los obtenidos en los análisis de pelo de las mismas pacientes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Instrumentación

3.1.1. Instrumentación para el pretratamiento de las muestras

- Balanza analítica Sartorius LE244S (Sartorius AG, Goettingen, Alemania).
- Sistema homogeneizador de tejidos T10 basic ULTRA-TURRAX® (IKA®, Staufen, Alemania).
- Agitador vórtex para tubos de ensayo Heidolph REAX 2000 (Heidolph, COMECTA S.A., Alemania).
- Centrífuga 5804R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).
- Cartuchos de extracción en fase sólida Oasis MCX 3cc 60mg (Waters Corp., Mildford, MA, USA).
- Evaporador TurboVap® Zymark (Biotage AB, Suecia).
- Centrífuga minispin (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

3.1.2. Instrumentación para la detección de los analitos

- Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a su respectivo espectrómetro de masas en tándem (LC-MS/MS), compuesto de:
 - o Cromatógrafo Alliance 2795 Separation Module (Waters Corp., Mildford, MA, USA).
 - o Horno de columna Alliance (Waters Corp., Mildford, MA, USA).
- Espectrómetro de masas-masas triple cuadrupolo Micromas Quattro Micro™ API (Waters Corp., Mildford, MA, USA).
- Ordenador provisto del software MassLynx (versión 4.1 SCN627), para el control del LC-MS/MS. Este software contiene el QuanLynx (versión 4.1 SCN627), empleado para el procesamiento de los resultados.
- Columna Atlantis® HILIC Silica 3µm, 2,1x100mm (Waters Corp., Manchester, UK).

3.2. Reactivos

- Agua ultrapura Mili-Q obtenida por un sistema de purificación (Milli-pore; Le-Mont-sur-Lausanne, Suiza).
- Disoluciones estándar en metanol de los patrones de referencia de nicotina, cotinina e hidroxicotinina (OH-cotinina) a 1 mg/mL (Cerilliant™; Round Rock, TX, USA).
- Disoluciones en metanol de los patrones internos de referencia de nicotina-d₄, cotinina-d₃ y OH-cotinina-d₃, a 100 µg/mL (Cerilliant™; Round Rock, TX, USA).
- Ácido fórmico (AF) 98-100 % (Scharlau; Sentmenat, España).
- Metanol (MeOH) grado gradiente para HPLC (Chromasolv®; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA).
- Diclorometano (DCM) ACS reagent (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA).
- 2-propanol (isopropanol, ISO) grado LC-MS (Fluka® Analytical; St. Louis, MO, USA).
- Hidróxido amónico (NH₄OH) al 32 % (Panreac; Castellar del Vallés, España).
- Acetonitrilo (ACN) grado LC-MS (Panreac; Castellar del Vallés, España).
- Formiato amónico (HCOONH₄, sólido) para LC-MS (Scharlau, Scharlab; Sentmenat, España).

3.3. Preparación de las disoluciones de trabajo

3.3.1. Preparación de las disoluciones de calibración y de control de calidad (QC)

Se han empleado diferentes disoluciones de trabajo para la elaboración de los calibradores y de los QCs. Inicialmente, se preparó una disolución de trabajo conteniendo nicotina y sus dos metabolitos a 10 µg/mL mediante la dilución de las ampollas individuales de cada compuesto (nicotina, cotinina y OH-cotinina a 1 mg/mL) en MeOH. Tras ello, se prepararon disoluciones seriadas con MeOH para obtener disoluciones de trabajo a 1 y 0,1 µg/mL. Para las muestras QC, se prepararon disoluciones de trabajo a la concentración de 0,5, 5 y 25 µg/mL empleando ampollas individuales de cada compuesto diferentes a las empleadas para la preparación de los calibradores. Además, se preparó una disolución conteniendo los patrones internos

(PI), nicotina-d₄, cotinina-d₃ y OH-cotinina-d₃, a 1 µg/mL, mediante la dilución de las ampollas individuales de cada compuesto (a 100 µg/mL) en MeOH.

Se prepararon calibradores a 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 ng/g (para la nicotina, cotinina y OH-cotinina), adicionando 50 o 100 µL de las disoluciones de trabajo apropiadas a muestras de placentas y cordones blanco (de mujeres no expuestas al humo del tabaco). Las muestras QC a concentración baja, media y alta (15, 150 y 750 ng/g, respectivamente), se prepararon adicionando 30 µL de las correspondientes disoluciones QC a muestras de placentas y cordones blanco. Las Tablas 5 y 6 muestran la preparación de la recta de calibrado y de las muestras QC, respectivamente.

Tabla 5. Preparación de la recta de calibración.

| [] Nicotina y sus metabolitos (ng/g) | Blanco | 5 | 10 | 50 | 100 | 500 | 1000 |
|---------------------------------------|--------|----|-----|----|-----|-----|------|
| Placenta/Cordón (g) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 0,1 µg/mL (µL) | - | 50 | 100 | - | - | - | - |
| 1 µg/mL (µL) | - | - | - | 50 | 100 | - | - |
| 10 µg/mL (µL) | - | - | - | - | - | 50 | 100 |
| PI 1µg/mL (µL) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |

Tabla 6. Preparación de las muestras QC.

| Disoluciones QCs (ng/g) | Bajo (15) | Medio (150) | Alto (750) |
|-------------------------|-----------|-------------|------------|
| Placenta/Cordón (g) | 1 | 1 | 1 |
| 0,5 µg/mL (µL) | 30 | - | - |
| 5 µg/mL (µL) | - | 30 | - |
| 25 µg/mL (µL) | - | - | 30 |
| PI 1µg/mL (µL) | 50 | 50 | 50 |

3.3.2. Preparación de otras disoluciones

- AF 10% en agua (10 mL): en un matraz aforado de 10 mL se añade 1 mL de AF 98-100% y se enrasa a 10 mL con agua Mili-Q.
- AF 0,1% en agua (100 mL): en un matraz aforado de 100 mL se añaden 100 µL de AF 98-100% y se enrasa con agua Mili-Q.
- DCM:ISO:NH₄OH (23,75:71,25:5, v:v:v) (100 mL): en un matraz aforado de 100 mL se añaden 23,75 mL de DCM, 5 mL de NH₄OH y se enrasa con ISO.
- ACN + 0,1% AF:MeOH (3:1, v:v) (10 mL): en un matraz aforado de 10 mL se añaden 2,5 mL de MeOH y se enrasa a 10 mL con la disolución de ACN + 0,1%AF.
- Formiato amónico 1M (50 mL): se pesan 3,153 g de formiato amónico sólido, se añaden en un matraz aforado de 50 mL y se enrasa a 50 mL con agua Mili-Q.
- Formiato amónico 2mM + AF 0,1% (500 mL): en un matraz aforado de 500 mL se añaden 1 mL de formiato amónico 1 M, 500 µL de AF 98-100% y se enrasa con agua Mili-Q.
- ACN + 0,1% AF (500 mL): en un matraz aforado de 500 mL se añaden 500 µL de AF 98-100% y se enrasa con ACN.

3.4. Preparación de la muestra

Se pesa 1 g de muestra (de placenta o de cordón umbilical), se trocea con unas tijeras y se le añaden 5 mL de agua Mili-Q. A continuación, se tritura mediante el sistema homogeneizador de tejidos hasta obtener un líquido homogéneo. El homogeneizado obtenido es traspasado a tubos de cristal de rosca y se le añaden las disoluciones estándar correspondientes con los analitos a las distintas concentraciones (en el caso de la elaboración de calibradores y de controles de calidad), 50 µL de la disolución de patrón interno y 50 µL de la disolución de ácido fórmico en agua al 10%, para que el medio se acidifique y los compuestos se ionicen. A continuación, se tapan los tubos, se agitan en el vórtex y se centrifugan durante 15 minutos a 4000 rpm y 10°C. Finalmente, se recoge el sobrenadante de cada tubo con la ayuda de pipetas Pasteur y se vierte en tubos de cristal de evaporación.

3.5. Extracción en fase sólida de la muestra

Para la SPE se seleccionaron los cartuchos Oasis MCX de 3cc y 60 mg (Waters Corp., Milford, MA, USA) de intercambio catiónico, que retienen a los analitos cargados positivamente mediante fuerzas electrostáticas, para lo que es necesario realizar un acondicionamiento de la muestra a un pH tal que, tanto los analitos de interés como los grupos funcionales de la columna, estén cargados positivamente. Por otro lado, la elución del analito se lleva a cabo mediante una solución con un pH que neutralice los grupos funcionales del compuesto o los del sorbente, cesando así la fuerza electrostática que los unía. En resumen, las etapas a seguir son las siguientes:

- Acondicionamiento del cartucho: 2 mL de MeOH, seguidos de 2 mL de H₂O Mili-Q.
- Carga de la muestra: se hace pasar por el cartucho el sobrenadante recogido tras la centrifugación.
- Lavado: se añaden 2 mL de AF al 0,1% en agua.
- Secado del cartucho: se realiza vacío durante 20 minutos con la ayuda de una bomba de vacío de presión negativa.
- Elución: se añaden 3 mL de DCM:ISO:NH₄OH (23,75:71,25:5, v:v:v).

Posteriormente a la SPE, se procede a realizar la evaporación del disolvente de elución en un evaporador de N₂ con un baño a 35°C, y el evaporado se reconstituye en 200 µL de ACN + 0,1% AF:MeOH (3:1, v:v) y se agita en el vórtex. Las muestras reconstituidas son transferidas a tubos eppendorf y centrifugadas durante 10 minutos a 14000 rpm en el minispin, para eliminar posibles interferencias. Por último, el sobrenadante se traspasa a viales de cristal, y se inyectan 20 µL en el LC-MS/MS.

3.6. Condiciones de la cromatografía líquida (LC)

Para realizar el análisis cromatográfico se empleó una columna analítica Atlantis® HILIC Silica (3 µm, 2,1 x 100 mm) (Waters Corp.). Como fase móvil se utilizó una mezcla de Formiato amónico 2 mM con 0,1% de AF, y ACN con 0,1% de AF, empleando el gradiente que se muestra en la Tabla 7. El líquido de purga utilizado fue ACN. El flujo para la separación cromatográfica fue de 0,3 mL/min, y la temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C.

Tabla 7. Gradiente cromatográfico empleado en la separación de los compuestos estudiados.

| Tiempo (min) | Formiato Amónico 2mM + AF 0'1% (%) | ACN + AF 0'1% (%) | Flujo (mL/min) | Tª columna (°C) |
|--------------|---------------------------------------|----------------------|-------------------|--------------------|
| 0,0 | 5,0 | 95,0 | 0,3 | 30 |
| 10,0 | 60,0 | 40,0 | 0,3 | 30 |
| 15,0 | 5,0 | 95,0 | 0,3 | 30 |

3.7. Condiciones de la espectrometría de masas (MS/MS)

El espectrómetro de masas utilizado fue un triple cuadrupolo con una interfase API (ionización a presión atmosférica) electrospray en modo positivo (ESI+). Las condiciones de trabajo empleadas se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones del espectrómetro de masas.

| Parámetro | Valor |
|--------------------------------------|---------|
| Voltaje del capilar | 3 kV |
| Temperatura de la fuente | 130 °C |
| Temperatura del gas de desolvatación | 300 °C |
| Flujo del gas de desolvatación | 500 L/h |
| Flujo del gas de cono | 50 L/h |

Las transiciones mayoritarias y minoritarias seleccionadas para cada compuesto (la mayoritaria se indica subrayada y en negrita), junto con sus respectivos voltajes de cono, energía de colisión, tiempo de retención, y patrón interno utilizado, aparecen reflejados en la Tabla 9.

Tabla 9. Transiciones ión precursor-ión producto, voltaje de cono (VC), energía de colisión (EC), tiempo de retención (T_R) y patrón interno (PI) empleados para cada compuesto estudiado.

| Analito | Transición | VC (V) | EC (eV) | T_R (min) | PI |
|-------------|---------------------|--------|---------|-------------|----------------------------|
| Nicotina | <u>163,14→132,2</u> | 30 | 18 | 7,1 | Nicotina-d ₄ |
| | 163,14→116,7 | 30 | 26 | | |
| Cotinina | <u>177,09→79,5</u> | 35 | 22 | 3,7 | Cotinina-d ₃ |
| | 177,09→97,6 | 35 | 20 | | |
| OH-Cotinina | <u>193,15→133,8</u> | 30 | 18 | 3,5 | OH-Cotinina-d ₃ |
| | 193,15→79,5 | 30 | 24 | | |

3.8. Validación

Todas las metodologías analíticas que vayan a ser empleadas en un laboratorio deben haber pasado por un proceso de validación previo, como garantía de la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados que proporcionan [40]. Para la validación de nuestros métodos se evaluaron los siguientes parámetros: linealidad, exactitud, imprecisión (interdía, intradía y total), límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), selectividad, efecto matriz, rendimiento de la extracción, eficacia total del proceso y estabilidad tras 72 horas en el inyector.

3.8.1. Linealidad

La linealidad muestra la relación existente entre la respuesta obtenida en el sistema de análisis y la concentración del analito en la matriz, en un determinado rango de concentraciones.

Para determinar este parámetro se realizaron 4 rectas de calibrado con muestras de placenta en 4 días distintos, y otras 4 rectas de calibrado con muestras de cordón umbilical en otros 4 días diferentes. El ajuste de la recta fue realizado por regresión lineal ($y=bx+a$) y con un factor de ponderación de $1/x$. Se considera que la linealidad es satisfactoria si se obtiene un coeficiente de determinación (r^2) $\geq 0,99$, y si los valores de las residuales de los calibradores se mantienen en un $\pm 15\%$ del valor nominal,

excepto para el LOQ, para el que se permiten residuales de hasta un $\pm 20\%$ del valor teórico.

3.8.2. Exactitud e imprecisión interdía, intradía y total

La exactitud se define como la relación entre el resultado obtenido tras la realización del análisis de la muestra y el valor teórico, expresado en porcentaje. Dicho valor debe estar comprendido entre el 85% y el 115% del valor teórico de referencia, exceptuando el LOQ, para el que se permiten valores entre el 80% y 120%.

La imprecisión nos permite evaluar la reproducibilidad obtenida tras el análisis de varios replicados de la muestra a una determinada concentración. Se expresa en porcentaje de desviación estándar relativa o coeficiente de variación (%CV) entre los valores medidos para los replicados analizados para el cálculo de este parámetro, y debe ser $\leq 15\%$, excepto para el LOQ, para el que se permiten $\%CV \leq 20\%$. Para el cálculo de la imprecisión intradía, interdía y total se siguieron los criterios indicados por Krouwer y Rabinowitz [41].

La exactitud y la imprecisión fueron evaluadas a 3 niveles de concentración dentro del rango estudiado, correspondiendo estos niveles al QC bajo, QC medio y QC alto (15, 150 y 750 ng/g, respectivamente). Para ello, se analizaron 5 replicados de cada concentración durante 4 días distintos ($n=20$), para las dos matrices validadas, es decir, 4 días empleando muestras de placentas y 4 días empleando muestras de cordones, para validar los parámetros en ambos métodos.

3.8.3. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

El LOD o límite de detección se define como la menor concentración de analito que la metodología es capaz de detectar inequívocamente en una muestra. Se determinó empíricamente mediante el análisis de concentraciones decrecientes de los analitos (2,5, 1 y 0,5 ng/g) en muestras de placentas y cordones “blanco” (es decir, obtenidas de no consumidores) procedentes de individuos distintos, y previamente fortificadas con PI, analizando 3 replicados para cada nivel de concentración. Se estableció el LOD a la concentración que presentara una relación señal/ruido (S/N) ≥ 3 , siendo la señal la altura del pico analítico y el ruido la amplitud entre el mayor y el menor punto de la línea base en el área alrededor del pico del analito [42].

El LOQ o límite de cuantificación se define como la menor concentración de analito que la metodología es capaz de cuantificar en una muestra, con una imprecisión (%CV) $\leq 20\%$, una exactitud entre el 80 y el 120% del valor teórico, y con una relación señal/ruido ≥ 10 . Para su determinación se analizaron 5 replicados de muestras de placenta y 5 replicados de muestras de cordones “blanco” procedentes de distintos individuos, fortificadas con la disolución de patrón interno y a las que se les adicionó el patrón con los analitos de nuestro método a concentraciones de 5 ng/g.

3.8.4. Selectividad

La selectividad es un parámetro que mide la capacidad del método analítico para identificar los analitos de interés en presencia de compuestos tanto endógenos, de la matriz, como exógenos, que pudieran estar también presentes en la muestra, interfiriendo en el análisis.

La selectividad del método se ha evaluado para interferencias tanto exógenas como endógenas. Para evaluar el efecto de las interferencias endógenas, se analizaron 10 muestras de placentas y 10 muestras de cordones “blanco” procedentes de 10 individuos distintos no expuestos al humo del tabaco, previa fortificación con la disolución de patrón interno. Por otra parte, para la evaluación de las interferencias exógenas, se analizaron 4 muestras de placentas y 4 muestras de cordones “blanco”. Estas muestras fueron fortificadas con, además de la disolución de patrón interno, disoluciones de las sustancias que constituyen los posibles interferentes que podríamos hallar en casos reales: drogas de abuso (morfina, codeína, 6-acetilmorfina, metadona, EDDP, anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, cocaína, benzoilecgonina, ecgonina metiléster, cocaetileno, LSD, ketamina, norketamina, GHB) y fármacos (fentanilo, amitriptilina, paroxetina, zolpidem, zopiclona, ibuprofeno, omeprazol, paracetamol, diclofenaco, naproxeno, alprazolam, temazepam, lormetazepam, lorazepam, clonazepam, diazepam, nordiazepam, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, oxazepam, triazolam, nitrazepam, bromazepam) de uso común, a la misma concentración que el punto más alto de la recta de calibrado (es decir, 1000 ng/g).

3.8.5. Efecto matriz, rendimiento de la extracción y eficacia total del proceso

Estos 3 parámetros fueron evaluados simultáneamente. Todos fueron determinados a 2 niveles de concentración, correspondientes al QC bajo y al QC alto (15 y 750 ng/g, respectivamente).

En una muestra o matriz pueden estar presentes, además de los analitos de interés, otras muchas sustancias a mayores, y estas sustancias pueden incrementar o disminuir la señal de los analitos debido a la competencia en el proceso de ionización. Este fenómeno, conocido como efecto matriz, es dependiente de la matriz, del método de extracción y del tipo de ionización empleados, y es característico de los análisis mediante LC-MS/MS. La evaluación de este parámetro se realizó fortificando 10 muestras de placentas y 10 muestras de cordones “blanco” procedentes de 10 individuos distintos con los analitos y patrones internos después de realizar la extracción. El efecto matriz se calculó comparando la señal observada en estas muestras con la obtenida al analizar disoluciones de los preparadas en fase móvil a la misma concentración que las muestras, pero que carecen de la muestra o matriz biológica en sí (n=6).

El rendimiento de la extracción informa sobre la eficacia de este proceso, es decir, sobre la pérdida de analito que se produce durante el proceso de extracción, por ello, también es conocida bajo el término “recuperación”. Este parámetro se calcula comparando la media de las áreas de los picos de muestras blanco fortificadas antes de la extracción (n=6) con aquellas obtenidas en muestras fortificadas tras la extracción (n=10, obtenidas de diferentes individuos), y se expresa en porcentaje.

La eficacia total del proceso examina el efecto global del efecto matriz y del rendimiento de la extracción para cada analito. Se determina comparando la media del área de los picos de muestras blanco fortificadas previamente a la extracción (n=6) con el área de los picos de las muestras preparadas en fase móvil a la misma concentración (n=6), y se expresa en porcentaje.

3.8.6. Estabilidad

Mediante este parámetro se estudia la estabilidad química de un compuesto en una matriz dada, bajo condiciones específicas, durante intervalos de tiempo determinados. A la hora de obtener resultados fiables en cuanto a cuantificación, es indispensable que el o los compuestos a analizar permanezcan inalterados durante todo el proceso analítico. Para evaluar la estabilidad de un determinado analito, es necesario tener en cuenta las distintas etapas del análisis en las que dicho analito puede verse afectado de una forma u otra. Se evaluó la estabilidad de los compuestos en el inyector (a 6°C), para lo que las muestras a las concentraciones del QC bajo, medio y alto (5 replicados por cada QC) se inyectaron inmediatamente tras su preparación y se reinyectaron transcurridas 72 horas. La estabilidad de los compuestos se considera aceptable si se cuantifican los QC reinyectados con un máximo de variación de un $\pm 15\%$ en comparación con los QC preparados en fresco.

3.9. Aplicación a casos reales

Con el objetivo de verificar el método desarrollado, se analizaron muestras de placentas y cordón umbilical recogidas durante el año 2013 en el Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (CHUVI) como parte del “Proyecto Placenta”. El método fue aplicado al análisis de 61 muestras reales (31 de placenta y 30 de cordón umbilical), procedentes de 32 partos distintos (es decir, la mayoría de las muestras placenta-cordón umbilical proceden del mismo parto, a excepción de dos placentas y un cordón umbilical, que llegaron al laboratorio desemparejados, es decir, sin su respectivo cordón umbilical o placenta). Previamente a estos análisis, se había realizado en el laboratorio la determinación de nicotina y cotinina en muestras de pelo materno correspondientes a estos 32 casos, resultando 28 de ellos positivos a nicotina y/o cotinina, y 4 de ellos negativos (aunque las 4 mujeres habían admitido el consumo de tabaco durante el embarazo mediante un cuestionario).

Para analizar todos los casos reales, se pesó 1 gramo de cada muestra y se siguió el protocolo descrito en la presente memoria.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Método analítico

Durante el desarrollo del método se ensayaron diferentes disoluciones para la homogeneización de las muestras de placentas y cordones umbilicales: H₂O Mili-Q, AF 10% en agua y MeOH, obteniéndose los mejores resultados con H₂O Mili-Q.

Se realizaron también varias pruebas con el fin de que el proceso de extracción en fase sólida (SPE) fuera lo más eficiente posible en la extracción de los analitos de interés. Para ello, en primer lugar se realizaron ensayos con distintos tipos de cartuchos: OASIS HLB 3cc 60mg (Waters Corp., Mildford, MA, USA), Phenomenex Strata-X-C 60mg/3mL (Phenomenex, Torrance, CA, USA) y OASIS MCX 3cc 60mg (Waters Corp., Mildford, MA, USA), seleccionándose este último.

En cuanto a las disoluciones para la etapa de lavado de la SPE, se probaron las siguientes: AF 0,1% en agua, AF 10% en agua y H₂O Mili-Q. Concluyendo que la mejor disolución para el lavado era la de AF 0,1% en agua.

Para optimizar la elución de los compuestos de interés de los cartuchos se realizó un estudio empleando diversos disolventes. De esta manera, se probaron: MeOH:NH₄OH (98:2, v:v), MeOH:NH₄OH (95:5, v:v), MeOH:NH₄OH (90:10, v:v), DCM:ISO:NH₄OH (23,75:71,25:5, v:v:v), DCM:ISO:NH₄OH (47,5:47,5:5, v:v:v) y DCM:ISO:NH₄OH (71,25:23,75:5, v:v:v). Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar DCM:ISO:NH₄OH (23,75:71,25:5, v:v:v) y, por tanto, ésta fue la combinación empleada finalmente como líquido de elución.

Por otro lado, para realizar la separación cromatográfica de los compuestos, se ensayaron diferentes columnas, fases móviles y gradientes. Las columnas utilizadas fueron la Kinetex® (2.6µm EVO C18 Core Shell Column) (Phenomenex, Torrance, CA, USA), la Atlantis® HILIC Silica (3 µm, 2,1 x 100 mm) (Waters Corp., Mildford, MA, USA), la Synergi™ (4µm Polar-RP 80Å New Column 100 x 2.0 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) y la Atlantis® dC18 (3 µm, 2,1 x 5 mm) (Waters Corp., Mildford, MA, USA), obteniéndose los mejores resultados con la columna HILIC. Las disoluciones ensayadas para los gradientes fueron las siguientes: formiato amónico, MeOH, ACN, acetato

amónico y AF (reactivos solos y/o combinados entre ellos), observándose los mejores resultados con Formiato amónico 2mM + AF 0,1% y ACN + 0,1% AF, y empleando los gradientes expuestos en la Tabla 8. Las fases móviles estudiadas constituyeron combinaciones de AF, ACN, formiato amónico y MeOH, observándose los mejores resultados con la mezcla ACN + 0,1% AF:MeOH (3:1, v:v).

Aplicando las condiciones descritas, se consiguió la separación cromatográfica de los 3 analitos estudiados en menos de 7,5 minutos, con una duración total del análisis de 15 minutos. Se realizó la identificación de los analitos mediante la monitorización de dos transiciones características. También fue incluido como criterio de identificación el tiempo de retención de cada analito, cuyo valor debía estar comprendido en el rango de $\pm 0,2$ min de la media del tiempo de retención de los calibradores correspondientes. Por último, el tercer criterio de identificación fue la razón de iones (cociente entre el área de la transición mayoritaria y el área de la transición minoritaria), cuyo valor debía estar comprendido en el intervalo de $\pm 20\%$ del valor obtenido en los calibradores. Para la cuantificación de los analitos fue empleada la transición mayoritaria.

4.2. Validación

4.2.1. Linealidad

Las 4 rectas realizadas, tanto con muestras de placenta como con cordones, se ajustaron a un modelo de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, aplicándose un factor de ponderación de $1/x$. El rango de calibración para todos los compuestos en estudio y para ambas matrices fue de 5 a 1000 ng/g, cumpliéndose los criterios de aceptación para r^2 y las residuales, al obtenerse un valor de coeficiente de determinación $r^2 > 0,995$ en todos los casos. Los detalles se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Parámetros de la linealidad: media del coeficiente de determinación (r^2), de la ordenada en el origen y de la pendiente.

| Analito | r^2 | | Ordenada en el origen | | Pendiente | |
|-------------|----------|--------|-----------------------|---------|-----------|--------|
| | Placenta | Cordón | Placenta | Cordón | Placenta | Cordón |
| Nicotina | 0,9984 | 0,9983 | 1,5007 | -0,1839 | 1,0214 | 0,8042 |
| Cotinina | 0,9976 | 0,9976 | 2,2250 | 0,7255 | 1,3745 | 2,2677 |
| OH-Cotinina | 0,9964 | 0,9984 | 2,1326 | -2,8815 | 1,6464 | 3,3732 |

4.2.2. Exactitud e imprecisión interdía, intradía y total

La exactitud obtenida para todos los compuestos y en ambas matrices se mantuvo dentro del rango de aceptación, con valores entre el 91 y el 106% de la concentración teórica. En cuanto a la imprecisión (%CV), todos los valores obtenidos fueron $<11,24\%$ para todos los compuestos y en ambas matrices, encontrándose también dentro de los criterios de aceptación. En la Tabla 11 se detallan los resultados de exactitud e imprecisión.

Tabla 11. Exactitud e imprecisión intradía, interdía y total obtenidas para los 3 compuestos analizados a 3 niveles de concentración.

| Analito | QC (ng/g) | Exactitud (%) (n=20) | | Imprecisión (%CV) | | | | | |
|-----------|--------------|-------------------------|--------|-------------------|--------|-----------------|--------|--------------|--------|
| | | | | Intradía (n=20) | | Interdía (n=20) | | Total (n=20) | |
| | | Placenta | Cordón | Placenta | Cordón | Placenta | Cordón | Placenta | Cordón |
| Nicotina | 15 | 100,91 | 99,04 | 5,82 | 3,98 | 5,10 | 10,40 | 7,74 | 11,13 |
| | 150 | 95,64 | 91,22 | 4,06 | 3,29 | 5,90 | 1,77 | 7,16 | 3,74 |
| | 750 | 94,35 | 95,88 | 3,07 | 3,74 | 11,64 | 8,20 | 12,04 | 9,01 |
| Cotina | 15 | 105,59 | 104,43 | 5,37 | 3,90 | 4,52 | 5,88 | 7,02 | 7,05 |
| | 150 | 99,38 | 91,64 | 2,92 | 3,07 | 9,37 | 3,01 | 9,81 | 4,30 |
| | 750 | 91,07 | 92,74 | 3,34 | 3,73 | 0,00 | 1,47 | 3,34 | 4,01 |
| OH-Cotina | 15 | 100,37 | 94,25 | 5,29 | 3,52 | 4,00 | 10,68 | 6,63 | 11,24 |
| | 150 | 94,60 | 91,09 | 4,26 | 4,12 | 8,29 | 2,18 | 9,32 | 4,66 |
| | 750 | 93,24 | 94,23 | 5,61 | 2,81 | 2,63 | 5,69 | 6,19 | 6,34 |

4.2.3. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

El LOD y LOQ obtenidos para los 3 analitos y para ambas matrices fue de 2,5 ng/g y 5 ng/g, respectivamente. En la Figura 9 se muestra un cromatograma de los 3 analitos al LOQ. Estas concentraciones aportan una sensibilidad suficiente para la identificación y cuantificación de estos analitos en muestras reales.

El valor del LOQ fue el mismo que obtuvieron Joya et al. [35] en placenta (5 ng/g para nicotina y cotina), aunque su método analítico se basó en la cromatografía de gases (GC-MS). Sin embargo, es peor que el obtenido por Marin et al. [25] en cordón umbilical, (0,25 ng/g para la cotina; 0,5 ng/g para la nicotina y la hidroxicotina), aunque en su caso se emplearon 1,5-2g de muestra, mientras que en este método solo 1g. No obstante, el LOQ obtenido en el presente método es suficiente para la detección de la exposición al tabaco en muestras de placenta y cordón umbilical de mujeres embarazadas, ya que es superior a las concentraciones encontradas por los autores previamente citados (32,5-119,5 ng/g de nicotina y 24,7-189,6 ng/g de cotina en placenta [35]; y 5,8-157,7 ng/g de cotina y 17,2-195,2 ng/g de OH-cotina en cordón umbilical [25]).-

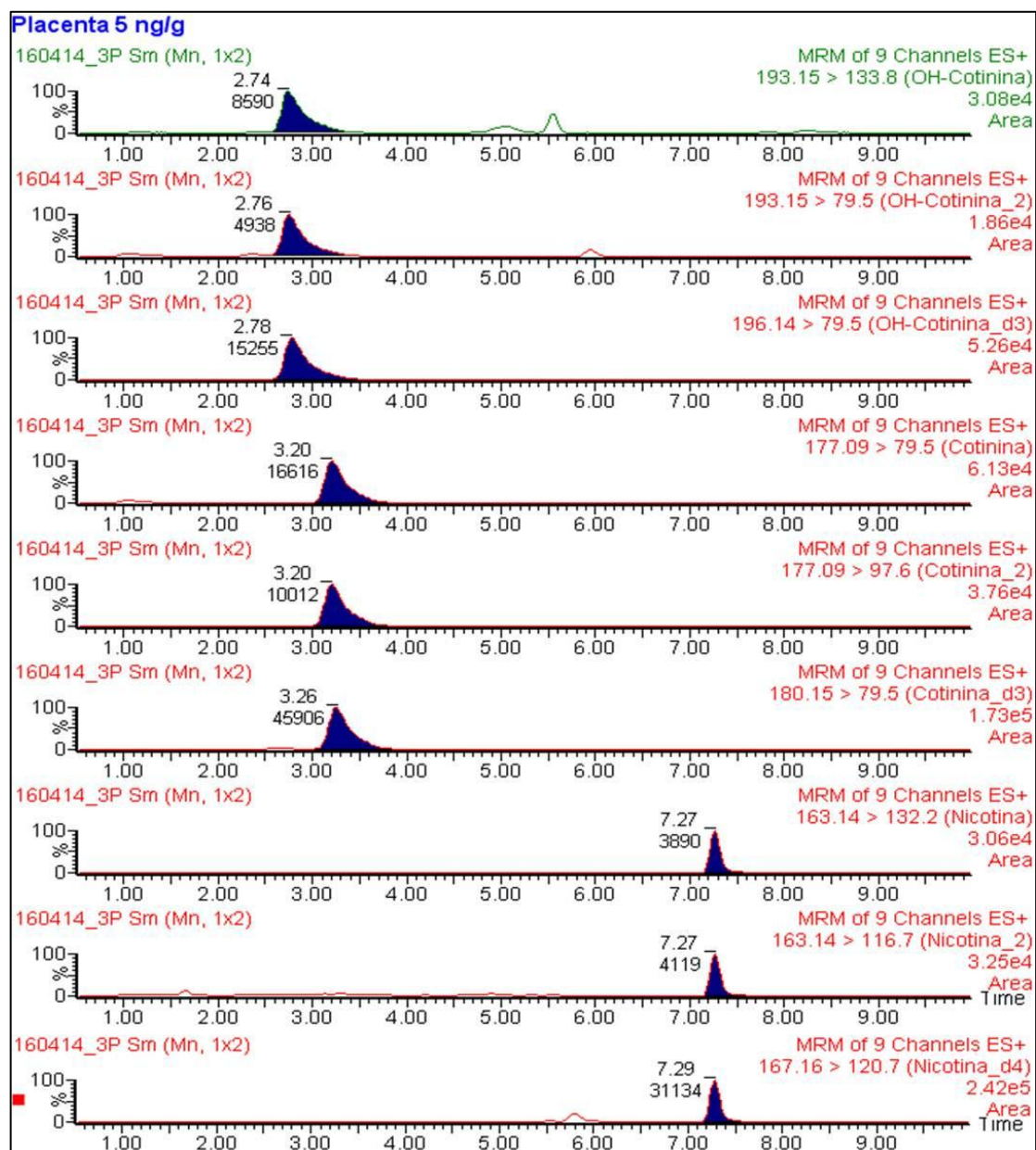


Figura 9. Cromatograma de las dos transiciones de la nicotina, cotinina y OH-cotinina y sus patrones internos al LOQ en una muestra de placenta.

4.2.4. Selectividad

El método desarrollado fue selectivo para los analitos estudiados en ambas matrices biológicas (placenta y cordón umbilical), ya que no se detectaron interferentes ni endógenos ni exógenos al tiempo de retención de los compuestos.

En la Figura 10 se muestra el cromatograma para cada analito y su correspondiente patrón interno tras el análisis de una muestra de cordón blanco fortificada con el patrón interno.

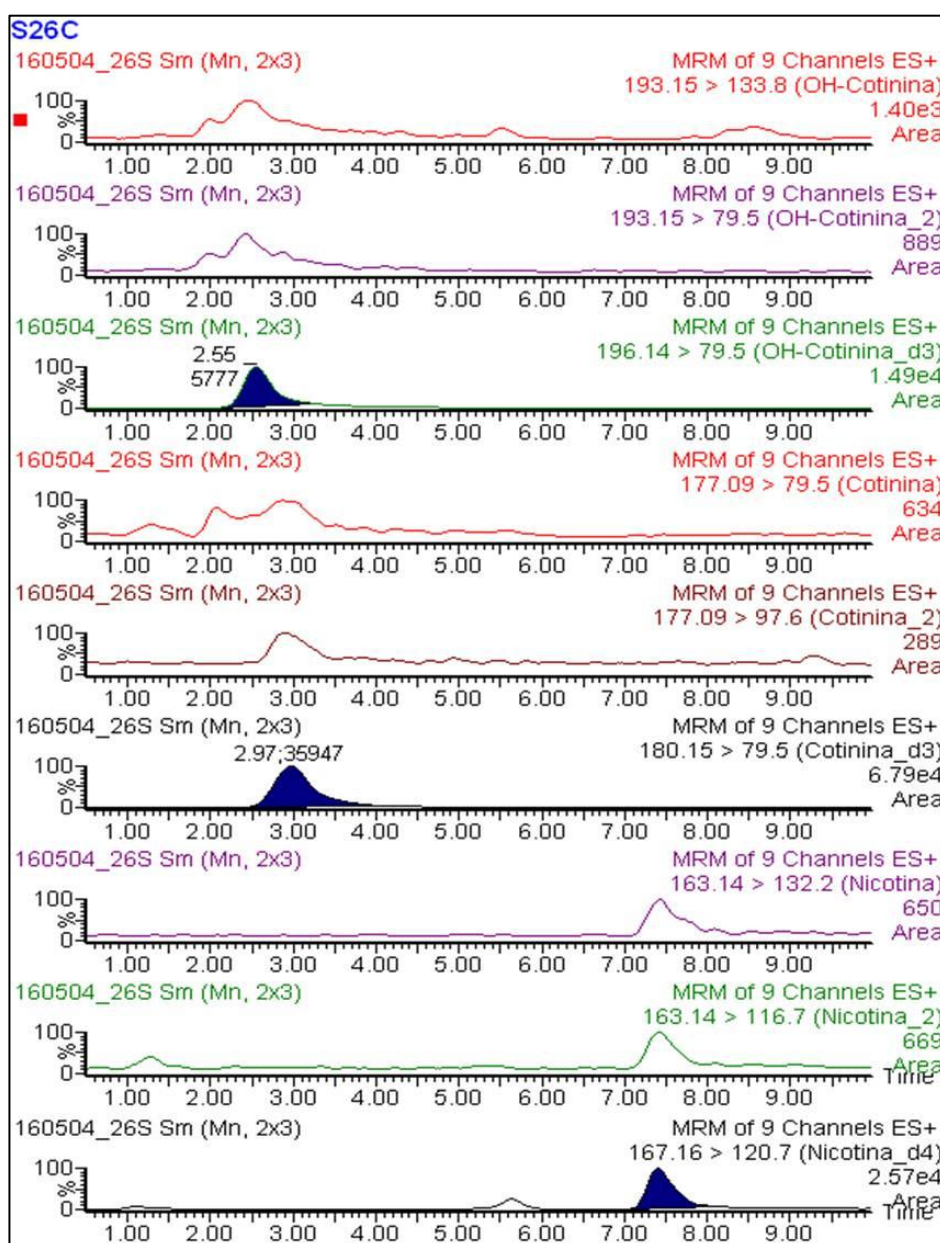


Figura 10. Cromatograma para cada analito y patrón interno tras el análisis de una muestra de cordón blanco.

4.2.5. Efecto matriz, rendimiento de la extracción y eficacia total del proceso

En placenta, el efecto matriz es positivo, tanto para nicotina como para cotinina, y tanto para el QC bajo como para el alto. Cabe destacar que, para ambos compuestos y sobre todo en el caso de la nicotina, el efecto matriz que se obtiene a la concentración del QC alto es muy superior al que se obtiene a la concentración del QC bajo, si bien este resultado se compensa con el hecho de que los patrones internos deuterados de ambos analitos presentan el mismo comportamiento. En cambio, la hidroxicotinina en placenta no presenta efecto matriz.

En cordón umbilical, para la nicotina se da una supresión de la señal a concentraciones bajas y un aumento a concentraciones altas, pero el patrón interno deuterado presenta el mismo efecto que compensa este resultado. En esta matriz, el efecto matriz se mantiene negativo (supresión de la señal) tanto para la cotinina como para la hidroxicotinina.

La Tabla 12 muestra los valores del efecto matriz para todos estos casos, además del %CV de las muestras analizadas, que indica que no hubo mucha variabilidad entre las muestras de distintos individuos (20% aproximadamente).

Tabla 12. Efecto matriz observado a concentraciones de 15 y 750 ng/g y porcentaje del coeficiente de variación (%CV).

| Analito | Conc. (ng/g) | Efecto Matriz | | %CV (n=10) | |
|----------------------------|-----------------|---------------|--------|------------|--------|
| | | Placenta | Cordón | Placenta | Cordón |
| Nicotina | 15 | 118,36 | -39,63 | 20,42 | 16,05 |
| | 750 | 1763,82 | 65,39 | 11,96 | 32,41 |
| Nicotina-d ₄ | 50 | 105,69 | -29,09 | 20,25 | 15,76 |
| Cotinina | 15 | 43,08 | -46,94 | 27,07 | 12,33 |
| | 750 | 103,49 | -41,08 | 5,96 | 29,48 |
| Cotinina-d ₃ | 50 | 71,00 | -24,51 | 27,51 | 12,23 |
| OH-Cotinina | 15 | 6,13 | -53,00 | 22,83 | 10,79 |
| | 750 | 1,58 | -32,35 | 11,57 | 11,01 |
| OH-Cotinina-d ₃ | 50 | 31,08 | -55,56 | 24,93 | 13,69 |

El rendimiento de la extracción obtenido fue >54%, es decir, la recuperación de todos los analitos en ambas matrices es elevada, indicando que la extracción de los

analitos es buena bajo las condiciones ensayadas (columnas y disolventes seleccionados). Además, el % CV entre los 6 replicados empleados en su cálculo es inferior al 22% en todos los casos, como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Rendimiento de la extracción para los 3 analitos a estudio.

| Analito | Conc. (ng/g) | Rendimiento de extracción (%) | | %CV (n=6) | |
|----------------------------|--------------|-------------------------------|--------|-----------|--------|
| | | Placenta | Cordón | Placenta | Cordón |
| Nicotina | 15 | 71,28 | 65,21 | 20,61 | 13,03 |
| | 750 | 78,64 | 68,64 | 5,94 | 8,09 |
| Nicotina-d ₄ | 50 | 77,59 | 61,41 | 19,64 | 9,62 |
| Cotinina | 15 | 77,74 | 68,79 | 21,79 | 6,52 |
| | 750 | 76,11 | 69,72 | 5,19 | 4,46 |
| Cotinina-d ₃ | 50 | 65,26 | 74,29 | 20,40 | 3,74 |
| OH-Cotinina | 15 | 68,96 | 75,61 | 9,59 | 9,50 |
| | 750 | 65,00 | 72,90 | 12,05 | 11,64 |
| OH-Cotinina-d ₃ | 50 | 54,38 | 84,60 | 13,83 | 9,68 |

La eficacia total del proceso observada se muestra en la Tabla 14, presentando valores entre 66,02-3791,97% para las muestras de placenta y entre 34,54-264,98% para las muestras de cordón umbilical. Esta elevada eficacia total del proceso detectada para algunos compuestos se debe al gran aumento de la señal ocasionado por el efecto matriz y al buen rendimiento de la extracción obtenido.

Tabla 14. Eficacia total del proceso (%).

| Analito | Conc. (ng/g) | Eficacia total del proceso (%) | |
|----------------------------|--------------|--------------------------------|--------|
| | | Placenta | Cordón |
| Nicotina | 15 | 169,41 | 39,37 |
| | 750 | 3791,97 | 264,98 |
| Nicotina-d ₄ | 50 | 172,86 | 43,55 |
| Cotinina | 15 | 111,24 | 36,50 |
| | 750 | 156,21 | 63,98 |
| Cotinina-d ₃ | 50 | 111,59 | 39,82 |
| OH-Cotinina | 15 | 73,19 | 35,54 |
| | 750 | 66,02 | 49,32 |
| OH-Cotinina-d ₃ | 50 | 71,28 | 37,52 |

4.2.6. Estabilidad

La variación observada entre las concentraciones obtenidas para las muestras analizadas en el momento de su preparación y las obtenidas en las muestras inyectadas tras pasar 72 h en el inyector del cromatógrafo a 6°C no fue significativa en ningún caso, ya que los porcentajes de pérdida obtenidos fueron <13,01% en todos los casos, como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Porcentaje de pérdida respecto a la señal obtenida en las muestras recién preparadas para cada uno de los analitos a estudio tras 72 horas en el inyector a 6°C.

| Analito | QC (ng/g) | Pérdida (%) | |
|-------------|--------------|-------------|--------|
| | | Placenta | Cordón |
| Nicotina | 15 | -4,97 | -13,01 |
| | 150 | -0,52 | -6,45 |
| | 750 | -0,02 | -3,06 |
| Cotinina | 15 | -9,07 | 5,44 |
| | 150 | -10,08 | -4,98 |
| | 750 | -0,61 | -12,55 |
| OH-Cotinina | 15 | -4,27 | -6,97 |
| | 150 | -7,75 | -2,64 |
| | 750 | -4,61 | -2,22 |

4.3. Aplicación a casos reales

Se analizaron 31 muestras reales de placenta y 30 de cordón umbilical recogidas en el año 2013 en el CHUVI, dentro del marco del “Proyecto Placenta”. Este proyecto de investigación tenía como objetivo el estudio de la prevalencia de consumo de drogas y fármacos en mujeres embarazadas, y por ello se recolectaron muestras de pelo, meconio, placenta y cordón umbilical de todas aquellas mujeres que daban a luz en este hospital y daban su consentimiento para participar en este estudio. Además, a cada una de las participantes se le realizaba una entrevista personal para conocer sus hábitos de consumo y sus características sociodemográficas.

La aplicación de la metodología desarrollada en el presente trabajo a estas muestras, permite incrementar el conocimiento sobre la exposición a tabaco de estas mujeres, al proporcionar marcadores de exposición directos de la exposición del feto al tabaco, frente a los marcadores indirectos previamente analizados (la entrevista materna y el análisis del pelo materno).

Las muestras analizadas se obtuvieron de mujeres que, o bien habían sido clasificadas como fumadoras mediante el análisis previo de su cabello, o bien, aunque no se había detectado nicotina ni cotinina en su cabello, habían admitido el consumo de tabaco durante la gestación. En efecto, como se puede observar en la Tabla 16, en 28 de estos casos el análisis de cabello materno había proporcionado un resultado positivo para nicotina o cotinina, mientras que en 4 el resultado en cabello era negativo pese a la admisión del consumo. En contraste con los resultados obtenidos en pelo materno, todas las muestras fueron positivas a al menos uno de los tres compuestos indicativos del consumo de tabaco en cordón umbilical, y solo 5 muestras fueron negativas o con valores <LOQ en placenta a los tres compuestos estudiados (V88, V92, V125, V149 Y V185, ver Tabla 16).

Las concentraciones en placenta detectadas oscilaron entre 5,36-25,93 ng/g para nicotina, 5,27-145,81 ng/g para cotinina y 7,36-105,53 ng/g para OH-cotinina, y entre 5,37-32,27 ng/g, 7,27-153,06 ng/g y 5,36-113,32 ng/g en placenta y cordón umbilical, respectivamente. Las concentraciones en cordón umbilical fueron superiores a las detectadas en placenta, siendo el metabolito cotinina el compuesto que presenta

mayores concentraciones en ambas matrices biológicas. Estos resultados son similares a los detectados por Marin et al. [25] y Joya et al. [35]. Además, otros estudios previos, han observado la acumulación de cotinina en el compartimento fetal, como por ejemplo en el líquido amniótico o en la sangre del cordón umbilical, tanto en fumadoras activas como pasivas [43].

Tabla 16. Muestras y resultados de los 32 casos reales en placenta y/o cordón umbilical comparados con los resultados obtenidos tras el análisis del cabello materno.

| | Casos | Nicotina (ng/g) | | | Cotinina (ng/g) | | | OH-cotinina (ng/g) | |
|--------------------------|-------------|-----------------|------------------|-----------------------------------|-----------------|------------------|-----------------------------|--------------------|------------------|
| | | Placenta | Cordón umbilical | Pelo materno | Placenta | Cordón umbilical | Pelo materno | Placenta | Cordón umbilical |
| Positivos en pelo | V2 | 6,71 | 8,77 | 2705,4; (4562,4; 7152,5) | 23,08 | 18,49 | 168,4; (217,7; 296,0) | 19,27 | 17,48 |
| | V4 | 25,93 | NA | 97148,9 | 145,81 | NA | 7430,4 | 105,53 | NA |
| | V7 | <LOQ | NA | 1505,2 | 5,27 | NA | 81,1 | <LOQ | NA |
| | V27 | 8,55 | 12,85 | 10313,1; (20744,9; 28851,0) | 39,68 | 50,19 | NEG; (NEG; NEG) | 18,78 | 38,64 |
| | V46 | 7,63 | 9,63 | 1733,5 | 17,57 | 20,64 | 43,9 | 16,65 | 28,82 |
| | V50 | 5,69 | 6,39 | 1770,5 | 7,11 | 10,58 | 92,6 | 8,26 | 12,88 |
| | V79 | <LOQ | 7,83 | 1845,1 | 6,79 | 9,69 | 112,7 | <LOQ | 6,72 |
| | V80 | 23,53 | 32,27 | 6697,5 | 77,25 | 99,13 | 423,7 | 53,58 | 83,36 |
| | V87 | 6,15 | 7,92 | 3844 | 18,88 | 25,52 | 261,6 | 12,05 | 15,14 |
| | V88 | NEG | 5,95 | 797,9; (1534,6; 3261,3) | <LOQ | <LOQ | NEG; (39,5; 7,3) | NEG | NEG |
| | V92 | NEG | 5,93 | 636,5 | <LOQ | <LOQ | 46,6 | NEG | NEG |
| | V99 | 5,67 | 6,52 | 20619,9 | 7,47 | 8,06 | 949,8 | 7,67 | 8,14 |
| | V102 | 7,83 | 6,94 | 4640 | 19,06 | 15,5 | 664 | 26,16 | 23,03 |
| | V103 | 12,61 | 10,73 | 20095 | 68,08 | 56,45 | 623,3 | 38,31 | 65,75 |
| | V125 | NEG | 5,37 | 3403,7 | <LOQ | <LOQ | 247,7 | <LOQ | <LOQ |
| | V128 | 16,54 | 22,17 | 3455,3 | 94,56 | 88,44 | 1210,6 | 48,15 | 67,93 |
| | V132 | 10,32 | 9,72 | 21559,6 | 39,92 | 41,22 | 1410,9 | 28,8 | 38,7 |
| | V135 | 6,49 | 6,92 | 7755,2 | 23,68 | 24,05 | 1231,6 | 11,26 | 13,36 |
| | V146 | 5,36 | 6,17 | 2840 | 8,26 | 9,12 | 693,6 | <LOQ | 5,36 |
| | V149 | <LOQ | 5,59 | 938,7 | <LOQ | <LOQ | 58,7 | NEG | <LOQ |

| | | | | | | | | | |
|--|------|-------|-------|--------------------------------|--------|--------|-----------------------------|-------|--------|
| | V159 | 17,6 | 21,12 | 687,4; (1011,1; 1882,5) | 71,13 | 72,73 | 100; (84,3; 80,3) | 32,72 | 35,61 |
| | V185 | <LOQ | 6,67 | 253,4; (695,2; 1086,9) | <LOQ | 7,27 | NEG; (28,8; 144,2) | <LOQ | <LOQ |
| | V201 | 12,36 | 13,6 | 3711,8 | 58,41 | 67,8 | 358,8 | 21,37 | 28,63 |
| | V202 | 21,26 | 32,02 | 7487,6 | 115,27 | 153,06 | 570,9 | 64,2 | 113,32 |
| | V235 | <LOQ | 8,6 | NEG; (107,8; 1138,4) | 12,32 | 16,36 | NEG; (18,0; 58,7) | 7,36 | 11,41 |
| | V239 | NA | 9,04 | NEG; (537,4; 2021,4) | NA | 20,54 | 460,8; (13,7; 78,4) | NA | 9,18 |
| | V247 | 5,47 | 8,73 | 1867,5; (3282,9; 6330,1) | 10,13 | 12,35 | 298,3; (398,1; 492,8) | <LOQ | <LOQ |
| | V251 | 19,28 | 19,09 | 3973,8; (3090,5; 3917,6) | 87,32 | 89,12 | 442,6; (316,3; 448,8) | 46,78 | 54,6 |
| Negativos en pelo pero admisión de consumo | V3 | 6,41 | 10,08 | NEG | 13,99 | 15,85 | NEG | <LOQ | 6,84 |
| | V20 | 6,89 | 8,17 | NEG | 23,67 | 25,14 | NEG | 18,23 | 26,58 |
| | V25 | <LOQ | 12,88 | NEG | 5,93 | 41,69 | NEG | 13,61 | 36,61 |
| | V29 | 12,59 | 6,12 | NEG | 43,69 | 7,48 | NEG | 36,57 | 8,79 |

*NA: no analizado; NEG: negativo

*Resultados en pelo materno: concentración obtenida analizando el cabello por segmentos correspondientes a cada trimestre del embarazo, tal que “3^{er} trimestre; (2^o trimestre; 1^{er} trimestre)”; cuando aparece un único dato de concentración, éste corresponderá únicamente a la concentración hallada en el segmento que refleja el 3^{er} trimestre del embarazo

Con estos resultados también podríamos confirmar la poca fiabilidad que ofrece la entrevista materna para la determinación del consumo de sustancias, ya que solo 14 de las 28 mujeres que mostraron un consumo positivo en cabello reconocieron que consumieron tabaco durante el embarazo. Si bien es cierto que, de estas 28 mujeres, 18 admitieron ser fumadoras pasivas, lo que también podría confirmar la hipótesis del efecto perjudicial equiparable o incluso mayor del consumo pasivo de tabaco comparado con el activo, también lo es el hecho de que, de las 14 mujeres que dieron positivo en cabello pero no admitieron ser fumadoras, solo 6 dijeron ser consumidoras pasivas, estableciéndose así de nuevo la hipótesis de la baja fiabilidad de la entrevista materna. Cabe destacar sin embargo, que de los 32 casos totales

analizados y positivos en alguna de las matrices, 18 de las mujeres admitieron ser consumidoras, lo que constituye un 56% de admisión, porcentaje muy elevado si se compara con el obtenido para el consumo de drogas de abuso, por autores como Lozano et al. [23], que obtuvieron un 11%.

En cuanto a los 4 casos que habían resultado negativos en cabello materno pero en los que se detectaron marcadores de consumo en muestras materno-fetales, podrían ser indicativos de una mayor sensibilidad de nuestro método y/o de una ventana de detección corta, tanto en placenta como cordón umbilical (ya que las concentraciones de los analitos son de rangos similares en ambas matrices), hecho ya planteado por autores como Narkowicz et al. y Lozano et al. [22,23], y que contrasta con las opiniones de otros autores como Gray et al. y Marin et al., que proponen una ventana de detección para el cordón umbilical similar a la del meconio [24,25].

Todos estos datos nos permiten a su vez observar, además, que el consumo de tabaco, tanto activo como pasivo, en mujeres embarazadas presenta una prevalencia importante aún en nuestros días.

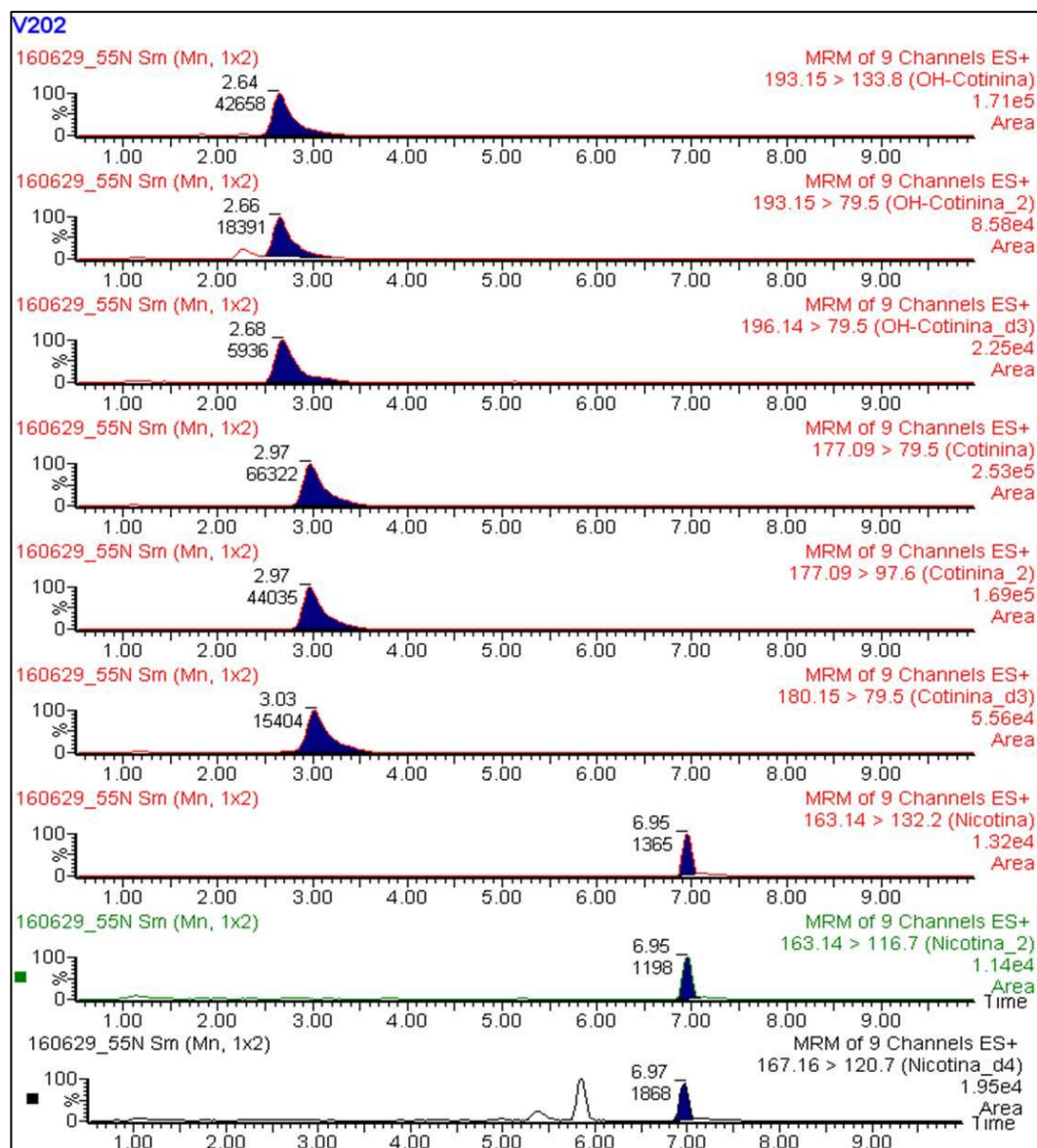


Figura 11. Cromatografía con el resultado de un caso real aplicando el método analítico de detección de nicotina y sus metabolitos en placenta (caso V202).

5. CONCLUSIONES

- 1) Se ha desarrollado un método analítico para la determinación nicotina y dos de sus metabolitos (cotinina e hidroxicotinina) en muestras de placenta y cordón umbilical, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
- 2) El método ha sido validado satisfactoriamente, cumpliéndose todos los criterios de aceptación, y demostrando ser un método sensible (LOQ = 5ng/g) y específico, al no demostrarse ningún tipo de interferencia, tanto endógena como exógena.
- 3) Se ha demostrado la utilidad de dicho método en la aplicación a casos reales, obteniéndose resultados coherentes con los datos aportados por el pelo y las entrevistas maternas. Los resultados pasarán a formar parte de la base de datos del Proyecto Placenta.
- 4) Esta es solo la primera etapa, que abre la puerta a futuras investigaciones sobre estas matrices, de gran potencial en toxicología.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] España. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Plan Nacional Sobre Drogas (PNSD). Informes y Estadísticas del Observatorio Español de la Drogas y las Toxicomanías (OEDT). Estadísticas 2015. [Online]. Disponible en: www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/informesEstadisticas/pdf/ESTADISTICAS_2015.pdf [Consultada 1 Febrero 2016].
- [2] Cruz A., Bouzas C., Concheiro M., de Castro A., Quintela O. et al. Drogas y teratogenia. *Adicciones* 2006; 18(1): 245-261.
- [3] Pichini S., Basagaña X., Pacifici R., García O., Puig C. et al. Cord Serum Cotinine as a Biomarker of Fetal Exposure to Cigarette Smoke at the End of Pregnancy. *Environ Health Perspect* 2000; 108:1079–1083.
- [4] Manich A., Velasco M., Joya X., García-Lara N.R., Pichini S. et al. Validez del cuestionario de consumo materno de alcohol para detectar la exposición prenatal. *An Pediatr* 2012; 76(6): 324-328.
- [5] Concheiro M, González-Colmenero E., Lendoiro E., Concheiro-Guisán A., de Castro A. et al. Alternative Matrices for Cocaine, Heroin, and Methadone In Utero Drug Exposure Detection. *Ther Drug Monit* 2013; 35: 502-509.
- [6] PRAMS, the Pregnancy Risk Assessment Monitoring System. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). [Online]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/prams/index.htm> [Consultada 1 Febrero 2016].
- [7] Graph of Tobacco Use 3 Months Before and Last 3 Months of Pregnancy (Based on CDC PRAMStat Data for 2011). PRAMS. Chronic Disease and Health Promotion Data & Indicators. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). [Online]. Disponible en: <https://chronicdata.cdc.gov/Maternal-Child-Health/Graph-of-Tobacco-Use-3-Months-Before-and-Last-3-Mo/mbvg-apdj> [Consultada 1 Febrero 2016].
- [8] Past Featured PRAMS Topics: PRAMS and Smoking. PRAMS. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). [Online]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/prams/tobaccoandprams.htm> [Consultada 1 Febrero 2016].
- [9] PRAMS and Smoking Data Tables (2000-2008). Past Featured PRAMS Topics: PRAMS and Smoking. PRAMS. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). [Online]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/prams/data-tobaccotables.htm> [Consultada 1 Febrero 2016].
- [10] INE (Instituto Nacional de Estadística). Indicadores Demográficos Básicos. Natalidad y Fecundidad: Indicadores de Fecundidad. Resultados nacionales y por comunidades autónomas. Edad Media a la Maternidad de la madre, 2015. [Online] Disponible en: <http://www.ine.es/dynt3/inebase/index.htm?padre=1365> [Consultada 1 Julio 2016].
- [11] Comín F., Aceña P.M. *El negocio del tabaco en la historia*. Documento de Trabajo; Programa de Historia Económica. Universidad de Alcalá y Fundación Empresa Pública; 1998.

- [12] OMS (Organización Mundial de la Salud). Programas y Proyectos. *Informe OMS sobre la epidemia mundial de tabaquismo, 2011*: Advertencia sobre los peligros del tabaco. [Online] Disponible en: http://www.who.int/tobacco/global_report/2011/es/ [Consultada 26 Marzo 2016].
- [13] AECC (Asociación Española Contra el Cáncer). *Cuadro de análisis de derecho comparado de la normativa en control del tabaquismo en la UE (marzo de 2010)*. Dirección General de Salud Pública y Sanidad Exterior: Observatorio para la prevención del tabaquismo. Ministerio de Sanidad y Política Social [Online] Disponible en: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/Prevencion/Tabaco/Documentacionenlaces/Documents/Microsoft%20Word%20-%20Copia%20de%20Cuadro%20derecho%20comparado%20tabaco%20UE.pdf> [Consultada 26 Marzo 2016].
- [14] AECC (Asociación Española Contra el Cáncer). Datos de interés sobre el tabaco. [Online] Disponible en: <https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/PREVENCIÓN/TABACO/Paginas/Datosdeinteres.aspx> [Consultada 26 Marzo 2016].
- [15] AECC (Asociación Española Contra el Cáncer). Tabaco: Documentación y Artículos de interés. López Jiménez, M. *Más de la mitad de los 1.200 millones de fumadores morirá por enfermedades relacionadas con su hábito*. *Jano.es* (2008). [Online] Disponible en: https://www.aecc.es/SobreElCancer/Prevencion/Tabaco/Documentacionenlaces/Documents/Mas_mitadfumadores_morira.pdf [Consultada 26 Marzo 2016].
- [16] Sastry B.V.R., Janson V.E. Smoking, Placental Function, and Fetal Growth. En: Rama Sastry B.V. (ed.) *Placental Toxicology*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press; 1995. p. 46-71.
- [17] Pérez López J.A. Tabaco, alcohol y embarazo en Atención Primaria. *Medicina Integral* 2000; 36(9): 343-354.
- [18] Reeves S., Bernstein I. Effects of maternal tobacco-smoke exposure on fetal growth and neonatal size. *Expert Rev Obstet Gynecol* 2008; 3(6): 719-730.
- [19] Schick S., Glantz S. Philip Morris toxicological experiments with fresh sidestream smoke: more toxic than mainstream smoke. *Tobacco Control* 2005; 14 (6): 396-404.
- [20] Martín Ruiz A., Rodríguez Gómez I., Rubio C., Revert C. y Hardisson A. Efectos tóxicos del tabaco. *Rev Toxicol* 2004; 21: 64-71.
- [21] Centers for Disease Control and Prevention (CDC, US). Chemistry and Toxicology of Cigarette Smoke and Biomarkers of Exposure and Harm. En: *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease. A Report of the Surgeon General*. U.S. Department of Health and Human Services, Rockville, MD, US; 2010. p. 29-79.
- [22] Narkowicz S., Plotka J., Polkowska Z., Biziuk M., Namiesnik J. Prenatal exposure to substance of abuse: A worldwide problem. *Environ Int* 2013; 54: 141-163.
- [23] Lozano J., García-Algar O., Vall O., de la Torre R., Scaravelli G. et al. Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse. *Ther Drug Monit* 2007; 29:711-34.

- [24] Gray T., Huestis M.A. Bioanalytical procedures for monitoring in utero drug exposure. *Anal Bioanal Chem* 2007; 388:1455-65.
- [25] Marin S.J., Christensen R.D., Baer V.L., Clark C.J., McMillin G.A. Nicotine and Metabolites in Paired Umbilical Cord Tissue and Meconium Specimens. *Ther Drug Monit* 2011; 33: 80-85.
- [26] Di Naro E., Raio L., D'Addario V. Cordón umbilical: evaluación ecográfica. En: Kurjak A., Chervenak F.A. (eds.) *Donald School: Ecografía en Obstetricia y Ginecología*. 2ª edición. Madrid, España: Ed. Médica Panamericana; 2009. p. 428-432.
- [27] Botella Llusíá, J. La placenta como filtro. En: Botella Llusíá, J. (ed.) *La placenta. Fisiología y Patología*. Madrid, España: Ed. Díaz de Santos S.A.; 1993. p. 113-130.
- [28] Botella Llusíá, J. El hígado transitorio. La placenta como órgano metabólico y de depósito. En: Botella Llusíá, J. (ed.) *La placenta. Fisiología y Patología*. Madrid, España: Ed. Díaz de Santos S.A.; 1993. p. 131-152.
- [29] Royal College of Physicians. *Nicotine addiction in Britain*. Londres: Royal College of Physicians, 2000.
- [30] Henningfield J.E., London E.D., Pogun S. Nicotine Psychopharmacology. En: Benowitz N.L., Hukkanen J., Jacob P. (eds.) *Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers*. Handbook of Experimental Pharmacology, V.192. Bethesda, MD, USA: Springer; 2009. p. 29-60.
- [31] Repetto Jiménez M., Repetto Kuhn G. Sistemáticas analíticas toxicológicas. En: Repetto Jiménez M., Repetto Kuhn G. (eds.) *Toxicología Fundamental*. 4ª Edición. Sevilla, España: Ed. Díaz de Santos S.A.; 2009. p. 521-544.
- [32] De Castro A. *Aplicación de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem a la determinación de antidepresivos en plasma*. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela; 2007.
- [33] Quintela O., Cruz A., Concheiro M., de Castro A., López-Rivadulla M. Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. *Rev Toxicol* 2005; 22: 7-14.
- [34] Miñones Trillo J. *Técnicas instrumentales para Farmacia*. Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.
- [35] Joya X., Pujadas M., Falcón M., Civit E., García-Algar O. et al. Gas chromatography-mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation. *Forensic Science International* 2010; 196: 38-42.
- [36] Byrd G.D., Davis R.A., Oqden M.W. A rapid LC-MS-MS method for the determination of nicotine and cotinine in serum and saliva samples from smokers: validation and comparison with a radioimmunoassay method. *J Chromatogr Sci* 2005; 43(3):133-40.

- [37] Baumann F., Regenthal R., Burgos-Guerrero I.L., Hegerl U., Preiss R. Determination of nicotine and cotinine in human serum by means of LC/MS. *J Chromatogr B* 2010; 878: 107–111.
- [38] Piller M., Gilch G., Scherer G., Scherer M. Simple, fast and sensitive LC–MS/MS analysis for the simultaneous quantification of nicotine and 10 of its major metabolites. *J Chromatogr B* 2014; 951-952: 7–15.
- [39] Fischer L., Mikus F., Jantos R., Skopp G. Simultaneous quantification of tobacco alkaloids and major phase I metabolites by LC-MS/MS in human tissue. *Int J Legal Med* 2015; 129:279–287.
- [40] Peters F.T., Maurer H.H. Bioanalytical method validation and its implication for forensic and clinical toxicology - a review. *Accred Qual Assur* 2002; 7: 441-449.
- [41] Krouwer J.S., Rabinowitz R. How to improve estimates of imprecision. *Clin Chem* 1984; 30: 290-292.
- [42] European Union Decision 2002/657/EC (17/8/2002) *Off J Eur Commun* 221: 8-36.
- [43] Llaquet H., Pichini S., Joya X., Papaseit E., Vall O. et al. Biological matrices for the evaluation of exposure to environmental tobacco smoke during prenatal life and childhood. *Anal Bioanal Chem* 2010; 396(1):379-99.

Agradecimientos

El presente Trabajo de Fin de Grado fue realizado en el Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses (sección de Toxicología Forense) de la USC.

Quiero dar las gracias en primer lugar a mi tutora, Angelines Cruz Landeira, Geli, por la minuciosidad, el cariño y los miles de ojos que ha puesto sobre las líneas bajo las que escribo, buscando constantemente la perfección. Gracias también a Elena Lendoiro Belío, por ayudarme en todo lo que he necesitado, sin importar a qué hora o en qué día me surgieran las dudas. También quiero agradecerle a Cristian toda su paciencia, su dedicación, su optimismo y su incansable sonrisa, tan necesarios e imprescindibles, sobre todo para afrontar el *sprint final* de este curso.

Gracias también a Pablo, por amenizarme con su sabiduría las largas tardes de trabajo en el laboratorio. A Ana, mi compañera al principio y amiga al final, y a José Ángel, por estar siempre ahí para apoyarnos mutuamente y hacer de la toxicología una ciencia si cabe aún más entretenida.

En resumen, gracias a todo el equipo del grupo FORTOX en general, por saber cuándo meternos presión y cuándo animarnos, y cómo hacer que me sienta vacía después de unos pocos días sin pisar el laboratorio.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia, por quererme tanto como para haberse leído y releído la presente memoria, aun sabiendo que no comprenderían la mitad del contenido, sólo para que me sienta más segura. A todos los amigos que han aportado su granito de ánimo y preocupación. Y por supuesto a A., por ayudarme a verlo todo un poco menos gris.